



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO CENTRAL E  
PERIFÉRICA DE LIGANTES DOS RECEPTORES ALFA<sub>2</sub>-  
ADRENÉRGICOS SOBRE AS RESPOSTAS DE DEFESA  
INDUZIDAS POR ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DA  
MATÉRIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL DORSAL DE  
RATOS

Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas

**Cláudia Janaina Torres Müller**

Orientador:  
Prof. Dr. Luiz Carlos Schenberg

Vitória-ES  
2010

Dissertação de Mestrado Apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde  
da Universidade Federal do Espírito Santo.

Vitória, 27 de Agosto de 2010.

Müller, Cláudia Janaina Torres

Efeitos da Administração Central e Periférica de Ligantes dos Receptores Alfa<sub>2</sub>-adrenérgicos sobre as Respostas de Defesa Induzidas por Estimulação Elétrica da Matéria Cinzenta Periaquedutal Dorsal de Ratos.

Müller, C. J. T. - Vitória, 2010.

Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Ciências fisiológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Schenberg

1-Ataque de Pânico, 2- Matéria Cinzenta Periaquedutal, 3- loimbina, 4- Clonidina, 5- Receptores alfa<sub>2</sub>-noradrenérgicos, 6- Estimulação elétrica.

**EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO CENTRAL E  
PERIFÉRICA DE LIGANTES DE RECEPTORES  
ALFA<sub>2</sub>-ADRENÉRGICOS NAS RESPOSTAS DE  
DEFESA INDUZIDAS POR ESTIMULAÇÃO  
ELÉTRICA DA MATÉRIA CINZENTA  
PERIAQUEDUTAL DORSAL DE RATOS.**

**Cláudia Janaina Torres Müller**

**Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de pós-graduação em ciências fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.**

**Banca examinadora:**

---

Prof. Dr. Luiz Carlos Schenberg (Orientador)  
Departamento de Ciências Fisiológicas – UFES.

---

Prof. Dr. Antônio de Pádua Carobrez  
Departamento de Farmacologia – UFSC.

---

Profa. Dra. Vanessa Beijamini Harres  
Departamento de Ciências Farmacêuticas – UFES

---

Prof. Dr. Luiz Carlos Schenberg  
Coordenador do Programa de Pós-graduação em  
Ciências Fisiológicas (PPGCF) - UFES

## **Agradecimentos**

Meus agradecimentos a minha família (mãe, pai, irmã e irmão), ao meu noivo Sandro, a todos que passaram pelo laboratório de neurobiologia comportamental, em especial a Jeyce, com que compartilhei boa parte das dúvidas e descobertas deste estudo, ao meu orientador Luiz Carlos Schenberg, aos amigos em especial a Rogeany, ao apoio financeiro da CAPES, a todos os funcionários da PPGCF, ao professor Nyan e sua assistente, ao casal Athelson e Ana Paula e aos ratos, que irremediavelmente cederam seus cérebros para este estudo.

*Não há diferença fundamental entre o Homem e os animais nas suas faculdades mentais(...) Os animais, como o Homem, demonstram sentir prazer, dor, felicidade e sofrimento.*  
*(Charler Darwin)*

Dedico este trabalho à família, ao Sandro,  
aos amigos e aos alunos e ex-alunos.

## Índice

Resumo.....	12
Abstract.....	15
Funções comportamentais dos receptores alfa <sub>2</sub> -adrenérgicos.....	18
O sistema noradrenérgico central.....	19
Os receptores adrenérgicos.....	22
Disfunções comportamentais e neurológicas associadas aos receptores $\alpha_2$ -adrenérgicos.....	24
O LC, a MCPA e o transtorno de pânico.....	30
Objetivos.....	36
Estudo I - Efeitos da administração periférica e central de ioimbina sobre os limiares das respostas de defesa induzidas pela estimulação elétrica da matéria cinzenta periaquedutal dorsal de ratos .....	39
Resumo.....	40
Introdução.....	41
Material e métodos.....	43
Resultado.....	49
Discussão.....	56
Estudo II - Efeitos da administração periférica de clonidina sobre os limiares das respostas de defesa induzidas pela estimulação elétrica da matéria cinzenta periaquedutal dorsal de ratos.....	60
Resumo.....	61
Introdução.....	62
Material e métodos.....	63
Resultado.....	68
Discussão.....	71
Referências.....	74

## Índice de Figuras

### ESTUDO I

Figura 1	Sítios de estimulação elétrica dos grupos tratados com ioimbina i.p. e i.c. (MCPA e CG1/CG2).....	50
Figura 2	Sítios de microinjeção de ioimbina nas áreas CG1 e CG2 do córtex pré-frontal.....	51
Figura 3	Efeitos da administração periférica de IO (0, 2, 5 e 10 mg/kg; i.p.) sobre os limiares das respostas de defesa induzidas por estimulação elétrica da MCPD.....	52
Figura 4	Intensidades medianas e respectivos intervalos de confiança das respostas de defesa induzidas por estimulação elétrica da MCPD após administração periférica de ioimbina.....	53
Figura 5	Efeitos da administração na MCPD de veículo e ioimbina sobre os limiares das respostas de defesa induzidas por estimulação elétrica da MCPD.....	54
Figura 6	Efeitos da administração no CPF (CG1/CG2) de veículo e ioimbina sobre os limiares das respostas de defesa induzidas por estimulação elétrica da MCPD.....	55

### ESTUDO II

Figura 1	Sítios de estimulação dos ratos tratados com clonidina administrada por via sistêmica e local (MCPA CG1/)......	69
Figura 2	Efeitos da administração periférica das cinco doses de clonidina (0, 1, 2, 4, 8 mg/kg; i.p.) sobre os limiares das respostas de defesa induzidas por estimulação elétrica da MCPD.....	70
Figura 3	Efeitos da administração periférica das cinco doses de clonidina (0, 1, 2, 4, 8 mg/kg; i.p.) sobre os limiares das respostas de defesa induzidas por estimulação elétrica da MCPD.....	71



## Índice de Tabelas

### ESTUDO I

Tabela 1	Efeitos da administração periférica de ioimbina sobre os limiares da reação de defesa induzida por estimulação elétrica da matéria cinzenta periaquedutal.....	50
Tabela 2	Efeitos da administração de ioimbina na MCPD sobre os limiares da reação de defesa induzida por estimulação elétrica da matéria cinzenta periaquedutal.....	54
Tabela 3	Efeitos da administração de ioimbina em CG1/CG2 sobre os limiares da reação de defesa induzida por estimulação elétrica da matéria cinzenta periaquedutal.....	55

### ESTUDO II

Tabela 1	Efeitos da administração periférica de clonidina sobre os limiares da reação de defesa induzida por estimulação elétrica da matéria cinzenta periaquedutal.....	69
----------	---	----

## **Abreviaturas**

Ach – Acetilcolina

ADT – Anti-depressivos Tricíclicos

AC – Adenilato Ciclase

Ca<sup>+2</sup> – Íon cálcio

CER – Resposta Emocional Condicionada

CG1 – Área 1 do Córtex Cingulado

CG2 – Área 2 do Córtex Cingulado

CLO – Clonidina

CPF – Córtex Pré-frontal

CRH – Hormônio Liberador de Corticotrofina

DGA – Diacilglicerol

DSP-4 – N-(2-cloroetil)-N-etil-2-bromobenzilamina

FLX – Fluoxetina

GABA – Ácido gama-aminobutírico

LC – Locus Cerúleo

i.c.v. – Intracerebroventricular

IO – Ioimbina

i.p. – Intraperitoneal

IP<sub>3</sub> – Inositol trifosfato

ISRS – Inibidor Seletivo Recaptação de Serotonina

ISRN – Inibidor Seletivo da Recaptação de Noradrenalina

MCPD – Matéria Cinzenta da Periaquedutal Dorsal

MCPA – Matéria Cinzenta da Periaquedutal

MHPG – 3-metil 4-hidroxifenilglicol

MPT – Maprotilina

NA – Noradrenalina

SNC – Sistema Nervoso Central

TDAH – Transtorno de Deficit de Atenção e Hiperatividade

TEPT – Transtorno de Estresse Pós-Traumático

TP – Transtorno do Pânico

5-HT – Serotonina

6-OHDA – 6-hidroxidopamina

## **RESUMO**

**RESUMO: Efeitos da Administração Central e Periférica de Ligantes dos Receptores Alfa<sub>2</sub>-adrenérgicos sobre as Respostas de Defesa Induzidas por Estimulação Elétrica da Matéria Cinzenta Periaquedutal Dorsal de Ratos.** Müller, C. J. T. *Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Brasil, 2010.* Os ataques de pânico são precipitados por ioimbina (IO), um antagonista dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos, mas atenuados pela clonidina (CLO), um agonista destes receptores. Os comportamentos de defesa produzidos pela estimulação da matéria cinzenta periaquedutal dorsal (MCPD) do rato têm sido propostos como modelo de ataque de pânico. A MCPD projeta-se ao locus cerúleo, principal núcleo noradrenérgico, e estas áreas do córtex pré-frontal medial (CG1/CG2) que retornam projeções à última estrutura, completando um circuito mesencefálico-cortical. O locus cerúleo também projeta-se à MCPD. Portanto, este estudo examinou os efeitos da IO e CLO sobre os limiares das respostas de defesa eliciadas por estimulação elétrica da MCPD em 4 grupos (n=20/grupo): 1) ratos tratados com IO (2, 5 e 10 mg/kg, i.p.); 2) ratos tratados com CLO (1, 2, 4, 8  $\mu$ g/kg, i.p.); 3) ratos microinjetados com IO na MCPD (0,28 nmol/150 nL) e, 4) ratos microinjetados com IO em CG1/CG2 (0,07 nmol/150 nL). As drogas foram administradas em intervalos de 48 h, numa ordem balanceada. Os efeitos da IO e CLO foram comparados aos efeitos do veículo por meio de regressão logística. A administração periférica de IO facilitou a imobilidade e o trote na dose de 5 mg/kg, e o galope nas doses de 5 e 10 mg/kg. A microinjeção de IO na MCPD atenuou a defecação e, em menor grau, a imobilidade e o trote, mas facilitou a micção. A microinjeção de IO em CG1/CG2 somente atenuou a defecação e a micção. A CLO facilitou a defecação na dose de 2  $\mu$ g/kg e atenuou o salto nas doses maiores (4 e 8  $\mu$ g/kg). Portanto, a IO facilitou as respostas somáticas de

defesa induzidas por estimulação da MCPD e, principalmente, o galope, o qual tem sido sugerido como o melhor representante do ataque de pânico. Em contraste, a CLO atenuou a resposta de salto. Embora o galope e o salto não tenham sido afetados pelos tratamentos locais, estes tiveram efeitos variados sobre a defecação e micção, que não são componentes dos ataques de pânico, e atenuaram a imobilidade e trote que podem estar associados a respostas antecipatórias. Portanto, os efeitos da IO e CLO sobre o galope e salto não parecem ser mediados por receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos da MCPD e CG1/CG2.

**Palavras-chave:** Ataque de Pânico, Matéria Cinzenta Periaquedutal, loimbina, Clonidina, Receptores alfa<sub>2</sub>-noradrenérgicos, Estimulação Elétrica.

## **ABSTRACT**

**ABSTRACT: Effects of Central and Peripheral Administration of Ligands of Alpha<sub>2</sub>-adrenergic Receptors on the Defensive Behaviors Produced by Eletrical Stimulation of Dorsal Periaqueductal Gray Matter of Rats.** *Müller, C. J. T., MSc Thesis, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Brazil, 2010.* Panic attacks are precipitated by the alpha<sub>2</sub>-adrenergic receptor antagonist yohimbine, but attenuated by the respective agonist clonidine. Defensive behaviors produced by eletrical stimulation of dorsal periaqueductal gray matter (DPAG) of rats have been proposed as a model of panic attacks. The DPAG projects to the locus coeruleus (LC). In turn, the LC projects to medial prefrontal cortex areas (CG1/CG2) which project to the DPAG, making up a midbrain-cortical circuit that may modulate the defensive behaviors. The LC also sends projections to DPAG. Therefore, this study examined the effects of the IO and CLO on the thresholds of defensive behaviors produced by eletrical stimulation of DPAG in four groups (n=20/group): 1) rats peripherally treated with IO (2, 5 and 10 mg/kg, i.p.); 2) rats peripherally treated with CLO (1, 2, 4 and 8 µg/kg, i.p.); 3) rats microinjected with IO into DPAG (0.28 nmol/150 nL, i.c.) and, 4) rats microinjected with IO into CG1/CG2 (0.07 nmol/150 nL, i.c.). Drugs were administrated in 48 h (i.p.) or 96 h (i.c.) intervals according to a balanced order. Drug and vehicle effects were compared through logistic regression. IO peripheral administrations facilitated immobility and trotting in the dose of 5 mg/kg, and galloping with 5 and 10 mg/kg. In turn, the peripheral administration of CLO attenuated jumping at higher doses (4 and 8 µg/kg), but facilitated defecation with 2 µg/kg. The microinjection of IO into the DPAG attenuated mostly the defecation, but also immobility and trotting. In contrast, micturition was facilitated the microinjection of IO into the DPAG. Microinjections of IO into CG1/CG2 attenuated the defecation and micturition



only. Peripheral effects of IO and CLO are a further validation of DPAG-based model of panic attack. Microinjections into DPAG or CG1/CG2 had variable effects on defecation and micturition, which not are typical components of panic attacks. Although the galloping was not affected, the microinjection of IO into DPAG attenuated immobility and trotting, which are most likely associated to anticipatory anxiety and panic attacks, respectively. The present results suggest that neither the facilitatory effects of IO, nor the attenuating effects of CLO on DPAG-evoked defensive responses are mediated by  $\alpha_2$ -adrenergic receptors in the DPAG and CG1/CG2.

Keywords: Panic Attack, Periaqueductal Gray, Yohimbine, Clonidine,  $\alpha_2$ -Adrenergic Receptors, Electrical Stimulation.

## **REVISÃO**

## **FUNÇÕES COMPORTAMENTAIS DOS RECEPTORES ALFA<sub>2</sub>-ADRENÉRGICOS**

### **O SISTEMA NORADRENÉRGICO CENTRAL**

A noradrenalina (NA) é um importante neurotransmissor periférico e central. No sistema nervoso central (SNC), os neurônios noradrenérgicos estão restritos à região pontina e bulbar, onde estão organizados em 7 grupamentos de células, designados A1 a A7 (Dahlström and Fuxe, 1964).

O grupo A6 é conhecido como Locus Cerúleo (LC), que em latim significa “lugar celeste”, devido à pigmentação azulada de suas células em cortes frescos. O LC é o núcleo noradrenérgico mais importante e localiza-se bilateralmente no assoalho do quarto ventrículo na parte rostral da ponte. Ele reúne cerca de 45% a 50% dos neurônios noradrenérgicos cerebrais e suas extensões rostral (A6cg), ventral (A6sc) e caudal (A6/A4) formam o complexo noradrenérgico do LC (Nieuwenhuys, 1985).

As projeções ascendentes do LC compreendem o feixe noradrenérgico dorsal (mais calibroso), o feixe periventricular dorsal (menos calibroso), as eferências para o cerebelo (Lindvall e Björklund, 1974a) e innervam quase todo o cérebro, projetando-se para o neocórtex, hipocampo, amígdala, tálamo e hipotálamo (Moore and Bloom, 1979; Lindvall *et al.*, 1974b, Jones e Moore, 1977 e Ungerstedt, 1971).

As eferências descendentes do LC formam o ramo caudal do feixe periventricular dorsal, o ramo caudal do feixe noradrenérgico dorsal e as fibras cerúleo-espinhais. Em ratos, o ramo caudal do feixe periventricular dorsal termina os níveis do núcleo do trato solitário (Takahashi *et al.*, 1979), enquanto

em macacos rhesus encontrou-se um considerável número de fibras do LC para o núcleo motor dorsal do vago (Westlund e Coulter, 1980). Conforme estudos de Jones e Friedman (1983), o ramo caudal do feixe noradrenérgico dorsal de homens e macacos tem projeções que atingem o núcleo do lemnisco lateral, o núcleo sensorial principal do trigêmio, núcleos cocleares, núcleos pontinos, núcleo trigeminal espinhal e formação reticular rombencefálica. Já as fibras cerúleo-espinhais inervam todos os segmentos da medula espinhal, de forma bilateral e com decussações, terminando na parte ventral do corno dorsal (lâminas IV, V e VI), na matéria cinzenta intermediária e no corno ventral (Westlund e Coulter, 1980; Karoum *et al.*, 1980).

As aferências do LC são multivariadas e incluem fibras do núcleo central da amígdala, região pré-óptica, núcleo intersticial da estria terminal, área hipotalâmica lateral, matéria cinzenta da periaquedutal (MCPA), área ventral tegumentar, formação reticular mesencefálica e rombencefálica, LC contralateral, região parabraquial, núcleos da rafe, complexo vestibular, núcleos cerebelares profundos, grupos noradrenérgicos (A1, A2, A5) e adrenérgicos (C1 e C2) e zona marginal do corno dorsal da medula espinhal (Nieuwenhuys, 1985). Contudo, estudos eletrofisiológicos e hodológicos revelaram que os corpos celulares do LC recebem aferências diretas de um número pequeno de estruturas, incluindo o núcleo paragigantocelular, a área perifascicular do núcleo preposito hipoglosso, a parte dorsal do núcleo paraventricular do hipotálamo, a lâmina X da medula espinhal e duas áreas próximas ao LC, quais sejam, a porção caudal da MCPA e a região pericerulear ventromedial (Aston-Jones *et al.*, 1986, 1991).

Além das projeções noradrenérgicas de A6, os grupos noradrenérgicos A1, A2, A5 e A7 formam o feixe noradrenérgico ventral que ascende através da

zona reticular do tronco encefálico e segue rostralmente através do feixe prosencefálico medial, terminando em áreas mesencefálicas (MCPA ventrolateral e formação reticular), diencefálicas (todo o hipotálamo e camada interna da eminência mediana) e telencefálicas (área pré-óptica e núcleo intersticial da estria terminal) (Ungerstedt, 1971). Porém, estudos posteriores mostraram que os feixes noradrenérgicos dorsal e ventral não são facilmente separados, formando o “trato tegmental central” (Lindvall et al., 1974a; Swanson *et al.*, 1981), ou “feixe catecolaminérgico longitudinal principal” (Jones e Friedman, 1983).

O LC é muito sensível a estímulos ambientais externos e mudanças homeostáticas. Além disso, suas projeções estão envolvidas em respostas de luta e fuga, na regulação dos níveis de alerta, no controle do ciclo sono vigília, no aprendizado e memória e modulam respostas do sistema nervoso simpático como frequência cardíaca, pressão sanguínea e sinais de perigo para o organismo (Anand, 2000). Estimulações elétricas do LC de macacos promovem comportamentos que foram relacionados ao medo e ansiedade, e lesões bilaterais diminuem a ocorrência natural de alguns destes comportamentos no meio social (Redmond *et al.*, 1976a,b).

O sistema noradrenérgico central é sensível a vários neurotransmissores, peptídeos e drogas. A atividade do LC é diminuída pela NA, serotonina (5-HT), ácido gama-aminobutírico (GABA), encefalinas e glicina, e aumentada pela acetilcolina (ACh), substância P, glutamato e hormônio de liberação da corticotrofina (CRH) (Charney *et al.*, 1990). Agentes com efeitos ansiolíticos ou panicolíticos, incluindo benzodiazepínicos, antidepressivos tricíclicos e clonidina, bem como opióides, diminuem a atividade dos neurônios do LC. Contudo, a buspirona, um agonista parcial de receptores 5-HT<sub>1A</sub> que

tem propriedades ansiolíticas, aumenta a taxa de disparo do LC. Drogas ansiogênicas, como a ioimbina e piperóxano, aumentam a atividade do LC mediante o bloqueio do autoreceptor inibitório  $\alpha_2$ -adrenérgico (Charney *et al.*, 1990).

## OS RECEPTORES ADRENÉRGICOS

Assim que a NA é liberada na fenda sináptica, ela interage com receptores específicos, chamados de adrenoreceptores, que são classificados nos tipos alfa- e beta-adrenérgicos ( $\alpha$ ,  $\beta$ ) e respectivos subtipos ( $\alpha_{1A-B,D}$ ;  $\alpha_{2A-C}$ ;  $\beta_{1-3}$ ) (Anand *et al.*, 2000).

Os receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos são especificamente bloqueados por prazosina. Três subtipos de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos foram identificados por clonagem, chamados  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$  e  $\alpha_{1D}$ . Outro receptor, o  $\alpha_{1C}$ , foi identificado no cérebro de boi. Contudo, mostrou-se que este receptor era idêntico ao receptor  $\alpha_{1A}$ . O receptor  $\alpha_{1A}$  é sensível ao antagonista WB4101, mas insensível à cloroetilclonidina, é encontrado no córtex cerebral de ratos. O receptor  $\alpha_{1B}$  apresenta baixa afinidade à WB4101, é bloqueado por doses baixas de cloroetilclonidina e foi primeiramente clonado no músculo liso de hamsters. O receptor  $\alpha_{1D}$  apresenta farmacologia distinta dos outros dois subtipos e é encontrado em tecidos periféricos. Todos os receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos estão acoplados a proteína  $G_q$  que ao ser ativada, aciona a fosfolipase C, levando à produção de diacilglicerol (DGA) e inositol trifosfato (i.p.<sub>3</sub>), o qual eleva as concentrações citosólicas de  $Ca^{2+}$ , ativando canais de cálcio voltagem-dependentes (Halbach *et al.*, 2002; Bylund *et al.*, 2000).

Os receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos estão envolvidos no principal mecanismo de regulação da atividade noradrenérgica central. Definidos como autoreceptores estão localizados tanto pré-sinápticamente quanto nos dendritos e corpos celulares, além da presença em membranas pós-sinápticas (Cooper *et al.*, 2003). Estes receptores controlam a liberação de NA na fenda sináptica por meio de um mecanismo de retroalimentação negativa (Charney *et al.*, 1990).

Três diferentes genes humanos para receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos são encontrados nos cromossomos 10, 2 e 4, chamados, respectivamente de  $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$ , e  $\alpha_{2C}$  (Bylund, 1992 e Bylund *et al.*, 1994). Um receptor  $\alpha_{2D}$ , descrito em camundongos e ratos, parece ser um gene específico de roedores, homólogo ao dos receptores  $\alpha_{2A}$  de humanos, diferindo em apenas um aminoácido (Halbach *et al.*, 2002). Os receptores  $\alpha_{2A}$  são encontrados nas plaquetas e no sistema nervoso central e periférico,  $\alpha_{2B}$  no fígado e nos rins e  $\alpha_{2C}$  somente no cérebro (Lorenz *et al.*, 1990).

Todos os receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos estão acoplados à proteína  $G_i$ , que inibe a adenilado ciclase (AC). A conseqüente redução dos níveis citosólicos de AMPc ocasiona a inibição dos canais de cálcio voltagem-dependentes e a ativação de canais de potássio dependentes de  $Ca^{2+}$  (Bylund *et al.*, 2000). Contudo as proteínas  $G_i$  dos receptores  $\alpha_{2B}$ , e  $\alpha_{2C}$  têm sensibilidades diferenciadas à toxina do pertussis, sendo insensíveis ou sensíveis a esta toxina, respectivamente (Halbach *et al.*, 2002).

Os receptores  $\beta$ -adrenérgicos foram originalmente classificados em dois tipos,  $\beta_1$  e  $\beta_2$ . Um terceiro receptor  $\beta$ -adrenérgico, insensível a maioria dos antagonista  $\beta$ -adrenérgicos, foi posteriormente classificado como receptor  $\beta_3$ . O receptor  $\beta_1$ , está presente principalmente no coração, mas também no cérebro

e nos adipócitos, e possui alta sensibilidade ao agonista isoproterenol e mesma sensibilidade à NA e adrenalina. O receptor  $\beta_2$  é encontrado no músculo liso vascular, uterino e das vias aéreas, e apesar da alta sensibilidade ao isoproterenol, sua sensibilidade à adrenalina é maior que à NA. O receptor  $\beta_3$  foi identificado no tecido adiposo, promovendo a lipólise dos adipócitos e termogênese. Todos os receptores  $\beta$ -adrenérgicos estão acoplados a proteína Gs, que ativa a AC levando ao aumento de AMPc e das concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  (Bylund *et al.*, 2000).

## DISFUNÇÕES COMPORTAMENTAIS E NEUROLÓGICAS ASSOCIADAS AOS RECEPTORES $\alpha_2$ -ADRENÉRGICOS

Como os autoreceptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos regulam a liberação de NA dos neurônios pré-sinápticos, os níveis plasmáticos de NA e MHPG podem refletir a função normal ou anormal destes receptores (Gurguis *et al.*, 1999).

Os receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos podem estar envolvidos em síndromes neurológicas como o mal de Parkinson, o Alzheimer (Szot *et al.*, 2006) e o transtorno do déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) (Arnsten *et al.*, 1996).

Embora a doença de Parkinson seja caracterizada pela perda dos neurônios dopaminérgicos do sistema nigroestriatal, ela também promove uma perda neuronal em outros núcleos catecolaminérgicos, tais como o LC (Greenfield e Bosanquet, 1953) e a área ventral tegumentar de Tsai, a qual pode perder cerca de 50% dos seus neurônios (Dymecki *et al.*, 1996). A degeneração do LC causa a redução dos níveis de NA em várias áreas cerebrais, incluindo a substância negra e os núcleos caudado e accumbens, podendo causar o agravamento do mal de Parkinson. De fato, evidências da



literatura sugerem que a clonidina potencia a atividade dos antiparkinsonianos (Hill et al., 1999), sugerindo o sinergismo dos sistemas adrenérgico e dopaminérgico.

A autópsia de pacientes com doença de Alzheimer também mostra uma perda substancial de neurônios do LC (German et al., 1992). Contudo, as funções do LC podem ser parcialmente compensadas pelos neurônios sobreviventes (Elrod et al., 1997; Szot et al., 2006). Segundo Szot e colaboradores (2006), a compensação ocorreria por 4 mecanismos, quais sejam: 1) aumento da expressão da tirosina hidroxilase; 2) brotamento dos dendritos dos neurônios sobreviventes do LC em direção à região peri-cerúlea (pLC), 3) brotamento de axônios que se projetam ao núcleo dorsal da rafe e ao hipocampo e, 4) redução da expressão dos receptores  $\alpha_{1D}$ - e  $\alpha_{2C}$ -adrenérgicos do hipocampo. Curiosamente, estudos com autoradiografia de pacientes agressivos com mal de Alzheimer mostraram um aumento acentuado da concentração de receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos no córtex cerebelar quando comparados aos pacientes não agressivos, mas nenhuma diferença em relação aos indivíduos sadios (Russo-Neustadt e Cotman, 1997).

A disfunção dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos também parece ser responsável pelo funcionamento anormal do sistema noradrenérgico em vários transtornos psiquiátricos, tais como o transtorno de estresse pós-traumático (TEPT) (Southwick et al., 1999), a esquizofrenia (Hertel et al., 1999), reações agudas de estresse (Flügge et al., 1992; 1996), depressão (Anand e Charney, 2000) e ansiedade (Charney et al., 1984).

Estudos de Southwick e colaboradores (1995, 1997) sugerem que a atividade noradrenérgica esteja alterada em pacientes com TEPT. Estes trabalhos sugerem, ainda, que a reatividade aumentada dos neurônios

noradrenérgicos esteja associada a uma variedade de sintomas de alerta extremado e re-experiência do trauma, característicos do TEPT. Assim, a ativação dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos por agonistas seletivos como a clonidina, promove a diminuição do estado de alerta, da insônia, das respostas exageradas ao susto, dos pesadelos, irritabilidade e agressividade de ex-combatentes, ex-refugiados e crianças com TEPT (Southwick *et al.*, 1999).

Embora o aumento da função noradrenérgica possa ser devido a vários fatores, o estado funcional dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos pode ser testado pela sua resposta à clonidina. Uma outra abordagem envolve a avaliação da neurotransmissão  $\alpha_2$ -adrenérgica em plaquetas. Este método revelou que veteranos de guerra com TEPT apresentam sobrerregulação dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos e uma eficiência aumentada do acoplamento da proteína  $G_i$ . (Gurguis *et al.*, 1999).

Em roedores, a depleção de NA causa inatenção (Carli *et al.*, 1983 e Roberts *et al.*, 1976) e reduz a hiperatividade motora (Raskin *et al.*, 1983 e Pearson *et al.*, 1981), sugerindo o envolvimento de mecanismos noradrenérgicos nos sintomas centrais dos pacientes com TDAH. Numerosos estudos indicam a similaridade entre pacientes com TDAH e pacientes com lesões do córtex pré-frontal (CPF). De fato, as funções prefronto-corticais (atenção, memória operacional) são facilitadas pela neurotransmissão  $\alpha_{2A}$ -adrenérgica pós-sináptica (Arnsten *et al.*, 1996, 2007).

As alterações da neurotransmissão noradrenérgica podem ser fatores importantes na patofisiologia da esquizofrenia, bem como no tratamento dos sintomas negativos, déficits cognitivos e depressão de esquizofrênicos (Arnsten, 2004). Existem evidências de que o bloqueio dos receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos melhora a ação dos antipsicóticos na esquizofrenia (Svensson,

2003). Contudo, o bloqueio dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos com racloprida e idaxozano também tem efeito na eficiência dos antipsicóticos (Hertel et al., 1999). Os efeitos benéficos dos antagonistas  $\alpha_2$ -adrenérgicos na esquizofrenia são provavelmente devidos ao aumento da liberação de dopamina no CPF medial e accumbens/estriado que se segue à administração de idaxozano e racloprida, respectivamente. Contudo a ativação dos receptores  $\alpha_{2A}$ -adrenérgicos pós-sinápticos do CPF com clonidina, guanfacina e guanabenz também tem efeitos benéficos para os pacientes esquizofrênicos (Arnsten, 2004). Estes dados sugerem a disfunção dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos na esquizofrenia.

Disfunções dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos também estão associadas ao estresse. Apesar do estresse de restrição, em ratos, não causar alterações da expressão dos receptores  $\alpha_{2A}$ -adrenérgicos do LC (Sands et al., 1999), estudos com musaranhos (*Tupaia belangeri*) submetidos a 10 dias de estresse psicossocial revelou uma subregulação dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos (Flügge et al., 1992). Contudo, o estresse psicossocial crônico (10-28 dias), causou alterações tempo-dependentes dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos, reduzindo sua afinidade aos agonistas e aumentando ou diminuindo sua expressão em regiões específicas do cérebro (Flügge, 1996). De fato, enquanto Flügge e colaboradores (2003) observaram o aumento do número dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos após 6 semanas de estresse psicossocial em musaranhos, Meyer e colaboradores (2000) observaram uma redução de 25 % dos mesmos receptores no LC após 4 semanas do mesmo tipo de estresse. Por outro lado, o estresse psicossocial promoveu a sobrerregulação dos receptores  $\alpha_{2B}$ -adrenérgico do núcleo paraventricular do tálamo, uma área associada ao transporte de informações relacionadas ao estresse para o

prosencéfalo límbico (Heilbronner et al., 2004). Estes estudos sugerem que o estresse prolongado altera tanto o número quanto a sensibilidade dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos, bem como a atividade noradrenérgica central. Estes efeitos podem contribuir para as alterações comportamentais e fisiológicas dos indivíduos submetidos a períodos prolongados de estresse, tais como a alteração da função do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (Flügge et al., 1996; Heilbronner et al., 2004).

Adicionalmente, os camundongos nocauteados para o gene dos receptores  $\alpha_{2A}$ -adrenérgicos, ou com função prejudicada destes receptores, apresentaram um aumento expressivo (100%) do número dos neurônios noradrenérgicos do LC, bem como o aumento do volume destes neurônios no núcleo subcerúleo, sugerindo o envolvimento destes receptores no desenvolvimento do sistema noradrenérgico central. Estes camundongos também apresentaram uma resposta de congelamento mais intensa aos estímulos condicionados discretos, mas não ao contexto, sugerindo a participação dos receptores  $\alpha_{2A}$ -adrenérgicos no estresse e nas respostas condicionadas de medo (Davies et al., 2003).

Segundo Anand e Charney (2000), reduções das concentrações sinápticas de NA estão associadas aos sintomas depressivos. As alterações da neurotransmissão noradrenérgica também podem participar da etiologia da depressão. Segundo estes autores, a depressão é acompanhada por mudanças na responsividade e na densidade dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos pós-sinápticos, um fenômeno que ocorreria secundariamente à deficiência de NA. Porém, há evidências de aumentos na sensibilidade dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos pré-sinápticos na depressão, o que resultaria na deficiência de NA na fenda sináptica.

Estudos experimentais indicam que administração de antidepressivos tricíclicos (ADT) que são inibidores preferenciais da recaptação de noradrenalina (desipramina, nortriptylina e clordesipramina), promove uma redução aguda do feedback negativo nos neurônios noradrenérgicos do LC (Nyback et al., 1975). Em seguida, Svensson e Usdin (1978) mostraram, em estudos crônicos com o tricíclico não-seletivo imipramina, que este efeito é devido à subregulação dos autoreceptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos. Corroborando estes estudos, Linnér e colaboradores (1999) observaram que ratos tratados aguda e cronicamente com imipramina e administrados com o antagonista  $\alpha_2$ -adrenérgico idazoxano, apresentaram uma redução da taxa de disparo do LC após o tratamento agudo e um aumento da liberação de NA no córtex frontal após ambos os tratamentos. Sugerindo, que os antagonistas  $\alpha_2$ -adrenérgicos podem potencializar os efeitos dos antidepressivos na depressão maior.

Estudos preliminares mostraram que a administração intravenosa dos antagonistas  $\alpha_2$ -adrenérgicos ioimbina e piperóxona, em macacos de rabo curto (*Macaca arctoides*), produzia efeitos comportamentais semelhantes aos da estimulação elétrica do LC e aos comportamentos naturais de medo desta espécie (Redmond et al., 1979). Estudos posteriores sugeriram que o transtorno de pânico (TP) possa estar relacionado à hiperatividade noradrenérgica episódica que ocorre durante os ataques de pânico (Charney et al., 1984, 1986, 1987). A hipótese da disfunção  $\alpha_2$ -adrenérgica no TP vem de estudos pré-clínicos e clínicos que utilizaram agonistas e antagonistas deste receptor. Em estudos clínicos, a infusão intravenosa do antagonista  $\alpha_2$ -adrenérgico ioimbina produziu ataques de pânico em 63 % dos pacientes de pânico e em apenas 7% dos indivíduos saudáveis. Estes efeitos foram correlacionados ao aumento dos níveis de 3-metil-4-hidróxi-fenilglicol (MHPG),

principal metabólito da NA, em pacientes de pânico, e aumentos de cortisol em pacientes e voluntários. Por sua vez, o agonista  $\alpha_2$ -adrenérgico clonidina apresentou efeitos benéficos nos pacientes de pânico (Charney et al., 1992; Liebowitz et al., 1981).

## O LC, A MCPA E O TRANSTORNO DE PÂNICO

Embora as disfunções dos sistemas gabaérgico (Roy-Burne et al., 1989), colinérgico (Bataglia e Ogliari, 2005) e opioidérgico (Preter e Klein, 2008) tenham sido propostas como as causas primárias do TP, as propriedades panicolíticas amplamente conhecidas dos ADTs e inibidores seletivos da recaptação de 5-HT (ISRS) sugerem que ataques de pânico são causados pelo funcionamento anormal dos sistemas serotoninérgico e/ou noradrenérgico. A disfunção serotoninérgica no TP é fortemente apoiada pela ação panicolítica estabelecida dos ISRSs (Kahn et al., 1988a,b; Deakin e Graeff, 1991; Westenberg e Den Boer, 1993). Todavia, também existem relatos de tratamentos bem sucedidos do TP com inibidores seletivos (reboxetina) ou preferenciais (desipramina) da recaptação de NA. Além disso, enquanto o antagonista  $\alpha_2$ -adrenérgico ioimbina apresenta propriedades panicogênicas confirmadas (Charney et al., 1987; 1992; Bremner et al., 1996), pacientes de pânico mostram uma melhora rápida mas transiente após o tratamento com doses apropriadas do agonista  $\alpha_2$ -adrenérgico clonidina (Liebowitz et al., 1981). De fato, apesar do tratamento com clonidina bloquear, ou atenuar o pânico induzido por lactato, os ataques continuam a ocorrer em mais de 50 % dos indivíduos (Coplan et al., 1992). Estes dados sugerem que os ataques de pânico induzidos por lactato não podem ser totalmente explicados por

anormalidades da função noradrenérgica. Finalmente, a interação entre os sistemas monoaminérgicos não pode ser descartada. Desta forma, estudos recentes demonstraram que o IRSS paroxetina produz uma forte diminuição na taxa de renovação de NA (Gilmor et al., 2002).

Embora as propriedades ansiolíticas da clonidina, em homens e animais, sejam amplamente conhecidas há muitos anos (Davis et al., 1979; Crawley et al., 1985; Commisaris et al., 1990), a literatura sugere que pacientes com transtorno de ansiedade generalizada tenham pouco ou nenhum benefício com os inibidores da recaptação de NA. De fato, McLeod e colaboradores (2000) sugeriram que os efeitos ansiolíticos da imipramina possam ser devidos à ação ansiogênica do seu principal metabólito, a desipramina.

Conforme mencionado, a hipótese noradrenérgica do transtorno de ansiedade baseia-se nas observações da produção de respostas similares ao medo pela estimulação elétrica do LC de macacos em cadeiras de restrição (Redmond et al., 1976; Redmond e Huang, 1979). Particularmente, enquanto a estimulação do LC com estímulos de intensidades baixas provocou a resposta de alerta (abertura total dos olhos e giro contralateral da cabeça e do corpo), estímulos de alta intensidade produziram os comportamentos do 'Grupo I' que, supostamente, expressam a ansiedade (mastigação e movimentos da língua, ranger de dentes, agarrar-se à cadeira, coçar, bocejar, puxar o pêlo, contração das mãos, esforços para escapar da cadeira e espasmos isolados) (Redmond e Huang, 1979). Dentre estes comportamentos, somente a abertura e fechamento da boca, coçar e bocejar são observados em macacos de rabo curto numa situação ameaçadora natural (Bertrand et al., 1969). Todavia, Redmond e Huang (1979) demonstraram que enquanto os comportamentos espontâneos do Grupo I foram aumentados pela apresentação de uma luz

previamente pareada a um choque, estes comportamentos foram reduzidos por lesões do LC e por doses não sedativas de diazepam (0,15 mg/kg). A facilitação dos comportamentos do 'Grupo I' pelo medo condicionado torna improvável a produção artificial deste comportamento durante a estimulação do LC. Inversamente, comportamentos do 'Grupo I' foram aumentados por estimulação do LC por antagonistas  $\alpha_2$ -adrenérgico (piperoxano e ioimbina) e reduzidos pelo respectivo agonista (clonidina), endossando um papel específico da NA na ansiedade (Redmond e Huang, 1979).

A principal crítica da hipótese noradrenérgica da ansiedade foi formulada por Mason e Fibiger (1979). Estes autores mostraram que a depleção seletiva de NA pela microinjeção de 6-hidroxidopamina (6-OHDA) no tegumento dorsal não teve efeitos nem na aquisição, nem na retenção de uma grande variedade de comportamentos motivados por medo, incluindo a esquiva ativa de uma ou duas vias, a esquiva passiva, a esquiva não-sinalizada de Sidman, a resposta emocional condicionada (CER) e o teste de interação social. Adicionalmente, ratos com depleção noradrenérgica e controles, demonstraram o mesmo grau de supressão de resposta no CER. Inversamente, os ratos com depleção noradrenérgica apresentaram um aumento da inibição comportamental à novidade e o aumento da resistência à extinção da CER, da esquiva de Sidman e da esquiva ativa de duas vias, sugerindo níveis aumentados de medo.

Contudo, a depleção de NA também aumentou a resistência à extinção de comportamentos reforçados positivamente e melhorou a aquisição da esquiva de duas vias, aparentemente, devido à redução na inibição comportamental (imobilidade) que é intrínseca ao procedimento no qual os animais têm de fugir para o lado da caixa em que foram anteriormente punidos



(Mason e Fibiger, 1979). De fato, um efeito similar foi descrito para o tratamento com doses ansiolíticas de amobarbital (Gray, 1982). Adicionalmente, tanto as drogas ansiolíticas quanto o FLA-63, um depletor seletivo de NA, aumentaram as intensidades requeridas para a indução do ritmo teta hipocampal (7,7 Hz) por estimulação do septo medial. Este ritmo está associado à inibição comportamental que acompanha a frustração (remoção do reforço), o conflito experimental e a novidade e foi proposto como 'o ritmo específico da ansiedade' (Gray e McNaughton, 2000). Portanto, os resultados com FLA-63 sugerem o envolvimento da NA no sistema de inibição comportamental e na ansiedade.

Contrariamente, Mason e Fibiger (1979) propuseram que as projeções ascendentes do LC estão envolvidas na atenção. De fato, Libet e Gleason (1994) demonstraram que a estimulação elétrica do LC de humanos produziu apenas um estado de alerta, mas nenhuma resposta de medo ou ansiedade nem durante, nem após a estimulação. A estimulação do LC foi confirmada pelo aumento de 4 a 9 vezes dos níveis plasmáticos de MHPG

Embora os últimos estudos tornam improvável a contribuição direta do LC na produção dos estados ansiosos, este núcleo pode ter um papel modulatório, ou permissivo, na produção destes estados. Em particular, as respostas de defesa induzidas por estimulação elétrica ou química da metade dorsal da MCPA (MCPD) têm sido propostas como um modelo válido de ataques de pânico (Deakin e Graeff, 1991; Jenck et al., 1995, Schenberg et al., 2001; Vargas e Schenberg, 2001). Por outro lado, estudos de imunoistoquímica da proteína c-fos apresentaram evidências inquestionáveis da existência de projeções excitatórias da MCPD para o LC (Sandkuhler, 1991; Sandkuhler e Herdegen, 1995). De fato, embora a administração aguda de protriptilina (15

mg/kg), um inibidor preferencial da recaptação de NA, não tenha facilitado o comportamento de fuga induzido pela estimulação da MCPD (Kiser et al., 1978), a ioimbina facilitou este comportamento na caixa de vaivém (shuttle-box) (Jenck et al., 1995).

Portanto, com o objetivo de entender a função da MCPD e do LC nos ataques de pânico, estudos recentes de nosso laboratório analisaram as respostas de defesa induzidas pela estimulação elétrica da MCPD em ratos tratados com fluoxetina (FLX), um ISRS com conhecidas propriedades panicolíticas, ou maprotilina (MPT), um inibidor seletivo da recaptação de NA (ISRN) (Barbaccia et al., 1986) que carece de ações panicolíticas relevantes (Westenberg e Den Boer, 1993). As respostas defensivas também foram avaliadas 6 e 24 h após a administração intracerebroventricular (i.c.v.) de N-(2-cloroetil)-N-etil-2-bromobenzilamina (DSP-4), um inibidor seletivo da síntese de NA das projeções cerúleo-corticais e cerúleo-cerebelares, mas não cerúleo diencefálicas (Grzanna et al., 1989).

A administração de FLX em doses e regimes similares aos da terapia do pânico (1 a 5 mg/kg/dia, por 21 dias, i.p.) causou uma atenuação acentuada e seletiva da resposta de galope, aumentando seus limiares em 840%. Em contraste, a MPT causou a atenuação, também acentuada e seletiva, da resposta de imobilidade, cujos limiares foram aumentados em 115% (Schenberg et al., 2001, Vargas e Schenberg, 2001). É importante notar, no entanto, que a dose de MPT (10 mg/kg/dia, por 21 dias, i.p.) foi maior que as utilizadas na clínica (1 a 3 mg/kg). Por sua vez, a administração central de uma dose de MPT (10 µg/g em 15 µl, i.c.v.) proporcional à dose periférica atenuou todas as respostas de defesa, exceto o salto e a micção (Lugon, 2006). O

DSP-4 teve efeitos ainda mais acentuados, atenuando todas as respostas de defesa 6 e 24 h após sua administração (Lugon, 2006).

Portanto, embora os tratamentos crônicos sugiram o envolvimento mais pronunciado da 5-HT e NA no comportamentos respectivos de galope e imobilidade, os tratamentos centrais com drogas adrenérgicas sugerem uma função importante da NA e do LC em todas as respostas de defesa.

Os efeitos dos tratamentos crônicos sugerem que as respostas de imobilidade e galope correspondam aos estados de atenção e pânico, uma vez que elas foram atenuadas por MPT e FLX, respectivamente. Durante a reação de congelamento, a eliciação simultânea de imobilidade, exoftalmia e paralisia das vibrissas assemelha-se à resposta de orientação visuo-motora em que o foco da atenção desloca-se dos objetos próximos (exploração tátil, autolimpeza, etc) aos alvos distantes (predadores, etc). Esta resposta parece envolver o LC (Delangrage et al., 1993; Aston-Jones et al., 2000).

A atividade do LC também é fortemente aumentada durante o confronto de gatos, sugerindo sua participação nos comportamentos de defesa e agressão (Levine et al., 1990). Embora os estudos eletrofisiológicos de Ennis et al. (1991) questionem a presença de projeções diretas significantes da MCPD ao LC, estudos neuroanatômicos mostraram que o LC recebe densas projeções da MCPD (Meller e Dennis, 1991; Cameron et al., 1995), inclusive, projeções excitatórias reveladas por meio de imunistoquímica da proteína c-fos (Sandkuhler, 1991; Sahdkuhler e Herdegen, 1995). Portanto, embora os estudos com imunistoquímica da proteína c-fos não excluam a despolarização de interneurônios inibitórios, estudos eletrofisiológicos e neuroanatômicos que sugerem a presença de projeções excitatórias da MCPD ao LC que podem estar envolvidas com os efeitos acima mencionados das drogas adrenérgicas.

## **OBJETIVOS**

## OBJETIVO GERAL

O presente estudo analisou os efeitos dos ligantes dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos, ioimbina (antagonista) e clonidina (agonista) nas respostas de defesa eliciadas por estimulação elétrica da MCPD.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Verificar os efeitos da administração sistêmica (i.p.) de ioimbina nos limiares das respostas de defesa eliciadas por estimulação elétrica da MCPD.
- 2- Verificar os efeitos da microinjeção de ioimbina na MCPD sobre os limiares das respostas de defesa eliciadas por estimulação elétrica da mesma estrutura.
- 3- Verificar os efeitos da microinjeção de ioimbina em áreas do giro cingulado anterior (CG1/CG2) que estão associadas ao aumento da atenção, sobre os limiares das respostas de defesa eliciadas por estimulação elétrica da MCPD.
- 4- Verificar os efeitos de clonidina periférica nos limiares das respostas de defesa eliciadas por estimulação elétrica da MCPD.

## **ESTUDOS**

## ESTUDO I

# **EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO PERIFÉRICA E CENTRAL DE IOIMBINA SOBRE OS LIMIARES DAS RESPOSTAS DE DEFESA INDUZIDAS PELA ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DA MATÉRIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL DORSAL DE RATOS**

## RESUMO

Os ataques de pânico são precipitados por ioimbina (IO), um antagonista dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos. Por outro lado, as respostas de defesa eliciadas pela estimulação da matéria cinzenta periaquedutal dorsal (MCPD) têm sido propostas como um modelo de ataque de pânico. Portanto, o presente estudo examinou os efeitos da administração de IO, tanto periférica (i.p.) como intracraniana (i.c.), na própria MCPD ou em áreas pré-frontais (CG1/CG2) de projeção do sistema noradrenérgico do locus cerúleo. Ratos com eletrodos na MCPD foram divididos nos seguintes grupos (n=20/grupo): 1) IO i.p. (2, 5 e 10 mg/kg); 2) IO na MCPD (280 pmol/150nL), 3) IO em CG1/CG2 (70 pmol/150 nL). Sessões controle foram realizadas com o veículo. Os tratamentos foram realizados em intervalos de 48 h (i.p.) ou 96 h (i.c.), em ordem balanceada. Os limiares das respostas de defesa foram analisados por regressão logística. A IO periférica facilitou a imobilidade, o trote e o galope. A microinjeção de IO na MCPD atenuou a defecação e, em menor grau, a imobilidade e o trote, mas facilitou a micção. A microinjeção de IO em CG1/CG2 causou apenas uma atenuação da defecação e a micção. A facilitação das respostas somáticas de defesa pela administração periférica de IO corrobora o modelo de ataque de pânico por estimulação da MCPD. A ausência de efeitos dos tratamentos i.c. sugere ações em áreas diversas da MCPD e CG1/CG2, possivelmente, no próprio locus cerúleo.

**Palavras-chave:** Ataque de Pânico, Matéria Cinzenta Periaquedutal, Ioimbina, Receptores alfa<sub>2</sub>-noradrenérgicos, Estimulação Elétrica.



## 1. INTRODUÇÃO

O transtorno de pânico (TP) é caracterizado por ataques espontâneos de pânico, ansiedade antecipatória e, frequentemente, agorafobia (DSM-IV, 2000). As respostas de defesa eliciadas pela estimulação da metade dorsal da matéria cinzenta periaquedutal (MCPD) têm sido propostas como um modelo de ataque de pânico. De fato, estudos conduzidos por Nashold *et al.* (1969) mostraram que a estimulação elétrica da MCPD de voluntários sadios provoca reações emocionais de ansiedade, terror, sudorese, tremores e sensação de morte iminente, dentre outros sintomas associados aos ataques de pânico. Em ratos, a estimulação elétrica ou química desta região produz comportamentos defensivos de congelamento (imobilidade e exoftalmia) e fuga (trote, galope e salto) (Bittencourt *et al.*, 2004).

Dentre as várias respostas induzidas por estimulação da MCPD, o galope parece ser o melhor representante dos ataques de pânico, uma vez que foi seletiva e acentuadamente atenuado por inibidores da recaptação da serotonina (5-HT) (clomipramina e fluoxetina) administrados em doses e regimes similares aos da terapia do TP (Schenberg *et al.*, 2001).

Contudo, evidências pré-clínicas sugerem que a ansiedade e o medo também estejam relacionados ao aumento na atividade dos neurônios noradrenérgicos centrais do lócus cerúleus (LC) (Redmond 1979). Adicionalmente, estudos clínicos sugerem a regulação anormal do sistema noredrenérgico no TP (Charney *et al.*, 1990). Não obstante, estimulação elétrica do LC de humanos que causou aumentos de 4 a 9 vezes dos níveis plasmáticos de MHPG, o principal metabólito da noradrenalina (NA), somente produziu um estado de alerta (Libet e Gleason, 1994). Embora os últimos estudos tornam improvável a contribuição direta do LC na produção nos

estados ansiosos, a NA pode ter um papel tanto modulatório quanto permissivo na produção dos ataques de pânico, tal como sugerem os relatos de tratamentos do TP com inibidores seletivos ou preferenciais da recaptação de NA (Lydiard, 1987, Lydiard *et al.*, 1993; Kalus *et al.*, 1991; Sasson *et al.*, 1999; Versiani *et al.*, 2002; Dannon *et al.*, 2002; Seedat *et al.*, 2003; Nardi *et al.*, 2003; Bertani *et al.*, 2004). Contudo, enquanto o antagonista  $\alpha_2$ -adrenérgico ioimbina (IO) é um panicógeno estabelecido, precipitando ataques de pânico em 63% dos pacientes, mas somente em 7% dos controles (Charney *et al.*, 1987, 1992; Bremner *et al.*, 1996), doses apropriadas do agonista  $\alpha_2$ -adrenérgico clonidina promovem uma melhora rápida, mas transiente, dos pacientes com TP (Liebowitz *et al.*, 1981).

Estudos em animais também sugerem a participação da NA nos ataques de pânico. De fato, embora a administração crônica de maprotilina (MPT), um inibidor seletivo da recaptação de NA que carece de efeitos panicolíticos relevantes (Westenberg e Den Boer, 1993), não teve efeito algum sobre a resposta de galope produzida pela estimulação da MCPD, ela atenuou de forma seletiva e acentuada a resposta de imobilidade, a qual pode ser um componente da ansiedade antecipatória dos ataques de pânico (Schenberg *et al.*, 2001). Adicionalmente, a administração intracerebroventricular (i.c.v.) deste antidepressivo atenuou a maioria das respostas de defesa produzidas pela estimulação da MCPD (Lugon, 2006). Efeitos ainda mais acentuados foram obtidos pela administração central de DSP-4 (Lugon, 2006), um depletor seletivo das projeções cerúleo-corticais e cerúleo-cerebelares noradrenérgicas (Grzanna *et al.*, 1989). Por fim, a MCPD envia densas projeções excitatórias para o LC (Sandkuhler, 1991; Sandkuhler e Herdegen, 1995).

Os autoreceptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos estão localizados tanto nos corpos celulares e dendritos dos neurônios noradrenérgicos quanto nos botões terminais destes neurônios e em neurônios pós-sinápticos. De forma mais notável, estes receptores estão envolvidos no controle dos disparos e da liberação de NA dos neurônios do LC, um efeito que pode estar relacionado à precipitação dos ataques de pânico pela administração de IO. Portanto, o presente estudo examinou os efeitos da administração de IO, periférica e local (na MCPD e nas áreas CG1/CG2 do córtex pré-frontal), sobre os limiares das respostas de defesa eliciadas por estimulação elétrica da MCPD de ratos.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

*Animais:* Foram utilizados 60 ratos albinos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), machos, pesando entre 250 e 300 g, fornecidos pelo biotério da Universidade Federal do Espírito Santo. Os animais eram mantidos em gaiolas individuais com paredes de vidro (25 x 15 x 30 cm) e assoalho coberto por maravalha. Os ratos tinham livre acesso à água e comida e eram mantidos em ambiente com ciclo de iluminação de 12 h (luzes acessas às 6:00 h) e temperatura controlada (20-25 °C). Os experimentos e cuidados com os animais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais desta universidade (CEUA-UFES).

*Quimitrodos:* Eram confeccionados com um soquete de circuito integrado (Celis, BCPT 50, São Paulo-SP, BR). Um dos pinos era substituído por uma cânula-guia de aço inoxidável de 600  $\mu$ m de diâmetro e 11 mm de comprimento soldada ao soquete, que servia de guia para a agulha de microinjeção e de eletrodo indiferente. O eletrodo era confeccionado com um fio de aço inoxidável

(California Fine Wire Company, Grover City, EUA) de 250  $\mu$ m de diâmetro, isolado em toda extensão exceto na seção transversal.

*Cirurgia:* Os animais eram anestesiados com 400 mg/kg (i.p.) de hidrato de cloral (Isofar, RJ, BR) e fixados ao aparelho estereotáxico (David Kopf, Tujunga, EUA), com o bregma e o lambda no mesmo plano horizontal. Em seguida, realizava-se uma tricotomia da parte superior da cabeça e uma pequena área oval da pele e tecidos subcutâneos eram removidos, expondo-se a calota craniana à altura do lâmbda. Após a limpeza e secagem do campo, fazia-se 5 orifícios com o auxílio de uma broca odontológica, 2 em cada osso parietal e 1 na extremidade caudal do osso interparietal; que serviam para a introdução de parafusos de aço inoxidável e fixação da prótese cirúrgica. A seguir, realizava-se a trepanação da região do lambda com uma broca adiamantada (KG Sorensen 1016), expondo-se o cérebro à altura do seio venoso. O centro da confluência dos seios sagital e posterior era utilizada como referência para a implantação do quimitrodo. Com o auxílio de uma agulha hipodérmica perfurava-se a dura-máter, afastava-se o seio venoso e introduzia-se o quimitrodo em direção à região dorsolateral da matéria cinzenta periaquedutal de acordo com as coordenadas: 7,4 mm posterior ao bregma, 0,4 mm lateral ao plano sagital e 4,8 mm a partir da superfície do seio venoso. Em seguida, o campo cirúrgico era preenchido com resina autopolimerizável (JET, São Paulo, Brasil), fixando o quimitrodo aos parafusos e formando uma prótese sólida. O quimitrodo era protegido pela fixação de um tubo plástico de 1,0 cm de altura e diâmetro. Ao final, introduzia-se um estilete de aço inoxidável na cânula-guia, de mesmo comprimento da cânula, para protegê-la de uma

eventual obstrução. Ao término da cirurgia os animais recebiam tratamento com 24.000 UI de penicilina-G benzatina (i.m.) e eram mantidos em placa aquecida (30 °C) até a recuperação anestésica plena, sendo posteriormente transportados para suas respectivas gaiolas individuais e transferidos para o biotério.

Os ratos tratados com IO no córtex pré-frontal também eram implantados com uma cânula-guia de aço inoxidável, de 0,6 mm de diâmetro e 7 mm de comprimento, nas coordenadas em relação ao bregma: AP - 0 mm, LAT - 0,2 mm e VERT - 2,2 mm. Para isto, fazia-se um orifício com uma broca adiamantada e, após a introdução da cânula, a mesma era fixada aos parafusos de ancoragem com resina autopolimerizável. Em seguida, um estilete de aço inoxidável, do mesmo comprimento da cânula, era introduzido para sua proteção contra a eventual obstrução. Em seguida, fazia-se o procedimento de implantação do quimitrodo, descrito anteriormente.

*Estimulação elétrica intracraniana:* Cinco dias após a cirurgia, os ratos (n=60) eram submetidos a uma sessão triagem de estimulação. Os ratos eram conectados a um estimulador de corrente constante de pulso senoidal (FDV, Ribeirão Preto, SP, Brasil) por meio de um cabo leve e flexível acoplado a um conector giratório de mercúrio e colocados numa arena de acrílico transparente (*open-field*) de 60 cm de diâmetro e altura. Após um período entre 10 a 30 min de habituação os ratos eram estimulados com pulsos senoidais (0-70  $\mu$ A, 60 Hz, 30 s) de intensidades crescentes em passos de 5  $\mu$ A, aplicados em intervalos de 3 a 5 min e monitorados por um osciloscópio (V-121 Hitachi-Denshi, Malásia). Os comportamentos eram registrados de acordo com um etograma descrito em estudos anteriores (Schenberg *et al.*, 2001; Vargas *et al.*,

2001; Schenberg *et al.*, 2002; Bittencourt *et al.*, 2004, 2005). Os comportamentos foram registrados de modo binário, ou seja, como ‘emitidos’ ou ‘não’, independentemente de sua frequência ou duração durante o período de estimulação. Os experimentos foram conduzidos num ambiente com som atenuado e temperatura controlada (23-25 °C).

*Drogas:* A IO (hidrocloreto de ioimbina, Tocris, Bristol, RU) era dissolvida em 0,06 ml de Soluthol (BASF, Ludwigshafen, Germany) liquefeito em baixa temperatura, complementando-se o volume com salina (NaCl 0,9%) até a obtenção da concentração desejada.

*Microinjeções:* As microinjeções eram feitas por meio de uma seringa de precisão de 1 µl (Hamilton, EUA) acoplada a uma bomba de infusão (Insight, Ribeirão Preto, SP, Brasil). As drogas eram injetadas na velocidade de 71,3 nl/min por meio de uma cânula de polietileno (PE10, Clay Adams, EUA) e uma agulha endodôntica (0,3 mm de diâmetro) introduzida através da cânula-guia implantada em CG1/CG2 ou na MCPD. Para microinjeções em CG1/CG2 a agulha possuía 8 mm de comprimento e na MCPD tinha o comprimento exato do eletrodo de estimulação.

*Protocolo:* Os ratos que na sessão-triagem exibiram galopes ou saltos com intensidades inferiores a 60 µA foram submetidos aos tratamentos com salina (NaCl 0,9%), IO ou o respectivo veículo. Os ratos foram divididos em 3 grupos: 1) ratos administrados intraperitonealmente (n=20, i.p.) com veículo ou IO (2, 5 e 10 mg/kg) e, 30 min após, submetidos a sessões de estimulação elétrica, 2) ratos microinjetados na MCPD (n=20, i.c.) com IO (97,5 ng/150nl, nmol) ou

veículo e, 10 min após, submetidos à sessão de estimulação elétrica e, 3) ratos microinjetados no CG1/CG2 (n=20, i.c.) com IO (25,3 ng/150 nl; 0,071 nmol) ou veículo e, 10 min após, submetidos à sessão de estimulação elétrica. As sessões de estimulação eram conduzidas em intervalos de 48 h (i.p) ou 96 h (i.c.), em ordem balanceada.

*Análise histológica:* Ao término do experimento os ratos eram anestesiados com 1,5 dose anestésica de hidrato de cloral (600 mg/kg, i.p.), fixados a uma plataforma de perfusão e submetidos a uma toracotomia. Após exposição do coração e da ligadura da aorta descendente, introduzia-se uma agulha no ventrículo esquerdo e seccionava-se o átrio direito. Com o auxílio de uma bomba peristáltica (Masterflex CE 77120-70, Barrington, IL, EUA), o cérebro seqüencialmente perfundido com 200 ml de solução salina (NaCl 0,9 %) e 200 ml de solução de formaldeído (10 %). O sítio das microinjeções era confirmado por injeções *post-mortem* de 150 nl de azul de Evans (3 %). As cabeças eram mantidas por cerca de 10 dias em solução de formaldeído (10 %) e, em seguida, os cérebros eram retirados das caixas cranianas e mantidos por mais 2 dias em formaldeído. Por fim, os cérebros eram preparados em blocos e seccionados num micrótomo de congelamento (Jung AG, Heidelberg, Alemanha). Os cortes de 40 µm de espessura eram estendidos em lâminas gelatinizadas, desidratados, corados com vermelho neutro (Sigma, EUA) e montados com lamínulas e DPX (Aldrich Chemical Company, EUA). Os sítios das estimulações e microinjeções foram identificados com o auxílio de uma lupa (Olympus Optical-SZ40, Japão), fotografados (Sansung-SDC415ND,

Coréia), e registrados em diagramas coronais do atlas do cérebro do rato de Paxinos e Watson (1998).

*Análise estatística:* As curvas de probabilidade de resposta foram obtidas pelo ajuste logístico das frequências acumuladas das respostas limiares em função do logaritmo da intensidade de corrente para cada dose de IO nos três locais de administração, de acordo com o modelo:

$$P(y_{ij}|x_{ij}) = [1 + \exp(-(\alpha_j + \beta_j x_{ij}))]^{-1}$$

Onde:  $P$  é a probabilidade esperada da resposta  $y_{ij}$  para um dado estímulo  $x_{ij}$ ,  $\alpha_j$  é o intercepto e  $\beta_j$  a inclinação da *jésima* curva de intensidade-resposta para as doses de IO nos 3 locais de administração. Ajustes logísticos significantes foram avaliados pelo  $\chi^2$  de Wald ( $\chi^2_w = [\beta/EP]^2$ ), onde EP é o erro padrão de  $\beta_j$ . As curvas intensidade-resposta dos tratamentos farmacológicos foram parametrizadas por meio de variáveis indicadoras (0 e 1) e comparadas pela razão dos desvios de verossimilhança do modelo completo ( $k$  parâmetros) e dos modelos reduzidos ( $k-r$  parâmetros), proporcionando valores de  $\chi^2$  com  $r$  graus de liberdade ( $\chi^2_r$ ) das comparações para locação ou paralelismo das regressões. Os  $\chi^2_r$  dos testes gerais de locação e paralelismo, assim como o  $\chi^2$  de Wald, foram considerados significantes ao nível de 5 %. Os  $\chi^2_r$  dos testes pareados de locação e paralelismo (1 g.l.) foram considerados significantes segundo o critério de 5 % de Bonferroni. O ajuste por máxima verossimilhança foi realizado pelo procedimento “Logistic” do programa SAS (SAS®, Cary, EUA). As medianas ( $I_{50}$ ) assim como os respectivos erros padrões (EP) e o intervalo de confiança (IC 95 %) foram computados pelas fórmulas que se seguem:

$$\text{Log}(I_{50}) = \alpha/\beta$$



$$I_{50} = 10^{-\alpha/\beta}$$

$$EP\{\text{Log}(I_{50})\} = \{[\text{Var}(\alpha) - 2(\alpha/\beta)\text{Cov}(\alpha, \beta) + (\alpha/\beta)^2\text{Var}(\beta)]/\beta^2\}^{1/2}$$

$$EP(M_{50}) = I_{50}\{EP[\text{Log}(I_{50})]\}$$

$$IC95\%(I_{50}) = I_{50} \pm 1,96\{EP(I_{50})\}$$

Onde, as variâncias (Var) e covariâncias (Cov) dos parâmetros foram obtidas pela matriz estimada de covariância do procedimento Logistic. A descrição detalhada destes métodos pode ser encontrada em Collett (2003).

### 3. RESULTADOS

*Sítios estimulados eletricamente ou microinjetados com ioimbina.* Os ratos foram majoritariamente (90 %) implantados na MCPA. Os demais eletrodos localizaram-se nas camadas profundas e intermediárias do colículo superior. Os eletrodos foram igualmente distribuídos entre a MCPAdl e MCPAl (Fig. 1). As cânulas do córtex pré-frontal foram similarmente distribuídas entre as áreas 1 e 2 do córtex cingulado (CG1/CG2) (Fig. 2).

*Administração periférica de ioimbina.* Comparado aos controles, a administração de 5 mg/kg (i.p.) de IO reduziu os limiares de imobilidade ( $\Delta I_{50} = -16\%$ ;  $P < 0,01$ ), trote ( $\Delta I_{50} = -20\%$ ;  $P < 0,001$ ) e galope ( $\Delta I_{50} = -21\%$ ;  $P < 0,00001$ ). No mesmo sentido, a dose de 10 mg/kg de IO reduziu o limiar do galope ( $\Delta I_{50} = -12\%$ ;  $P < 0,001$ ). Em contraste, os limiares da micção foram aumentados pela IO nas doses de 5 mg/kg ( $\Delta I_{50} = 21\%$ ;  $P < 0,00001$ ) e

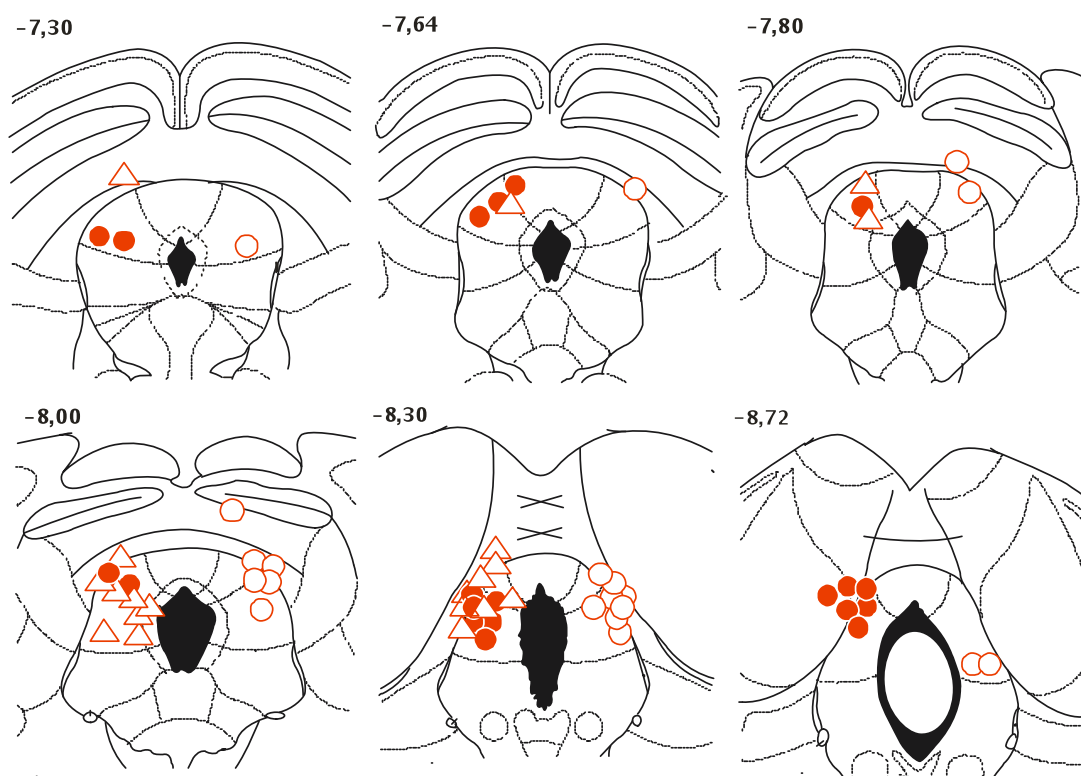


Figura 1- Sítios de estimulação elétrica dos ratos tratados com IO por via sistêmica (círculos sólidos) ou por via intracraniana na MCPD (círculos vazios) ou nas áreas CG1/CG2 do córtex pré-frontal (triângulos). Para evitar superposição, os sítios foram representados nos lados esquerdo e direito, porém foram estimulados do lado esquerdo. Os diagramas foram extraídos do atlas do cérebro de ratos de Paxinos e Watson (1986). Os números representam as coordenadas antero-posteriores em relação ao bregma.

Tabela 1- Efeitos da administração periférica de ioimbina sobre os limiares medianos ( $I_{50 \pm EP}$   $\mu A$ ) das respostas de defesa induzidas por estimulação elétrica da MCPD. \*  $P < 0,01$  \*\*  $P < 0,001$  \*\*\* $P < 0,0001$  \*\*\*\*  $P < 0,00001$ , diferenças significantes em relação à salina ( $\chi^2$  da razão de verossimilhança, critério de Bonferroni), # valor não estimável devido ao número insuficiente de respostas. EXO - exoftalmia, IMO - imobilidade, TRT - trote, GLP - galope, SLT - salto, MIC - micção, DEF - defecação.

	Salina	Ioimbina (mg/kg, i.p.)		
		2	5	10
EXO	28,5 $\pm$ 0,16	28,9 $\pm$ 0,14	28,5 $\pm$ 0,16	30,4 $\pm$ 0,14
IMO	27,6 $\pm$ 0,14	26,7 $\pm$ 0,13	23,2 $\pm$ 0,15*	27,3 $\pm$ 0,14
TRT	35,0 $\pm$ 0,14	31,5 $\pm$ 0,13	28,1 $\pm$ 0,15**	30,7 $\pm$ 0,13
GLP	41,7 $\pm$ 0,13	38,4 $\pm$ 0,12	33,1 $\pm$ 0,12****	36,8 $\pm$ 0,12**
SLT	57,3 $\pm$ 0,41	55,2 $\pm$ 0,28	61,5 $\pm$ 0,65	59,1 $\pm$ 0,48
MIC	65,2 $\pm$ 3,21	93,4 $\pm$ 6,12	110,8 $\pm$ 8,69***	153,8 $\pm$ 12,56****
DEF	103,2 $\pm$ 11,94	70,6 $\pm$ 4,38	#	#

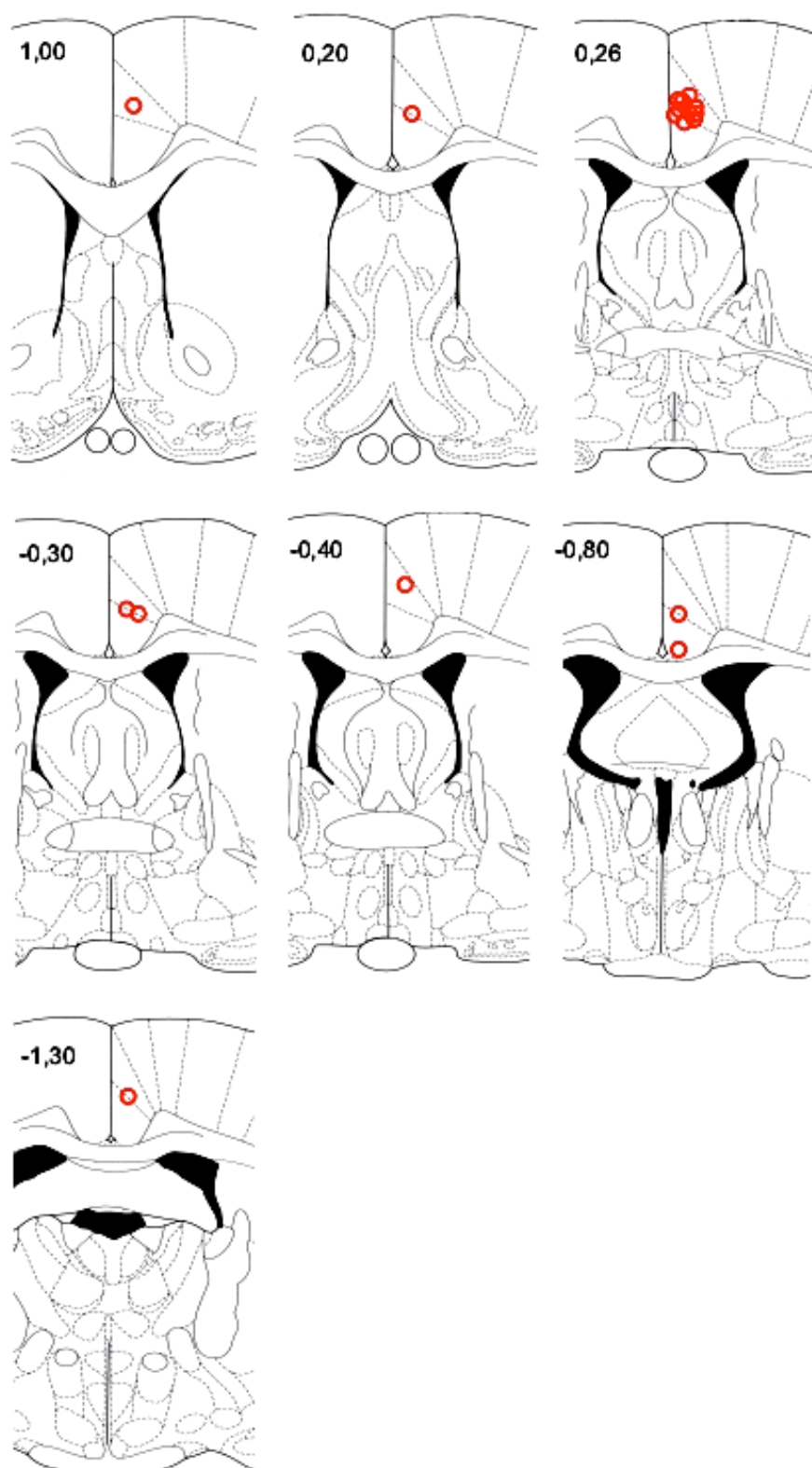


Figura 1- Sítios de microinjeção de ioimbina nas áreas CG1 e CG2 do córtex pré-frontal (círculos vazios) Os diagramas foram extraídos do atlas do cérebro de ratos de Paxinos e Watson (1986). Os números representam as coordenadas antero-posteriores em relação ao bregma

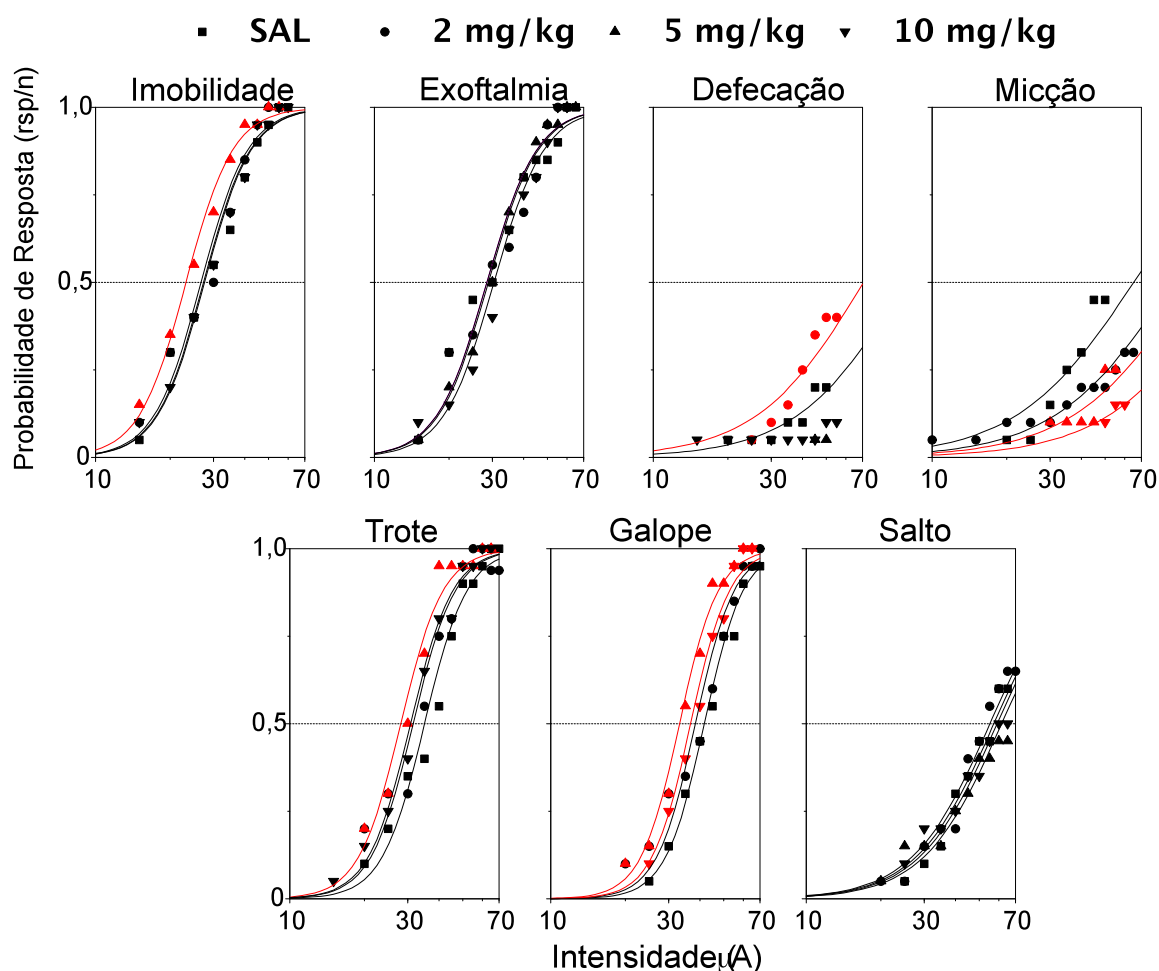


Figura 3- Efeitos da administração periférica de IO (0, 2, 5 e 10 mg/kg; i.p.) sobre os limiares das respostas de defesa induzidas por estimulação elétrica da MCPD. As curvas intensidade-resposta representam as funções de distribuição de probabilidade ajustadas segundo o modelo logístico para curvas paralelas. e. r - número de animais que apresentaram a resposta, n - número total de ratos estimulados. As linhas e os símbolos vermelhos indicam as diferenças significantes em relação à salina (teste do  $\chi^2$  da razão de verossimilhanças para locação, critério de 5% de Bonferroni.).

10 mg/kg ( $\Delta I_{50} = 136\%$ ;  $P < 0,0001$ ). Não foram observados efeitos significantes para dose de 2 mg/kg de IO, nem para as doses de 5 e 10 mg/kg de IO nas respostas de exoftalmia e salto. Por fim, as respostas de defecação não apresentaram ajustes estatisticamente significantes nos grupos tratados com 5 e 10 mg/kg de IO (Figs. 3-4, Tabela 1).

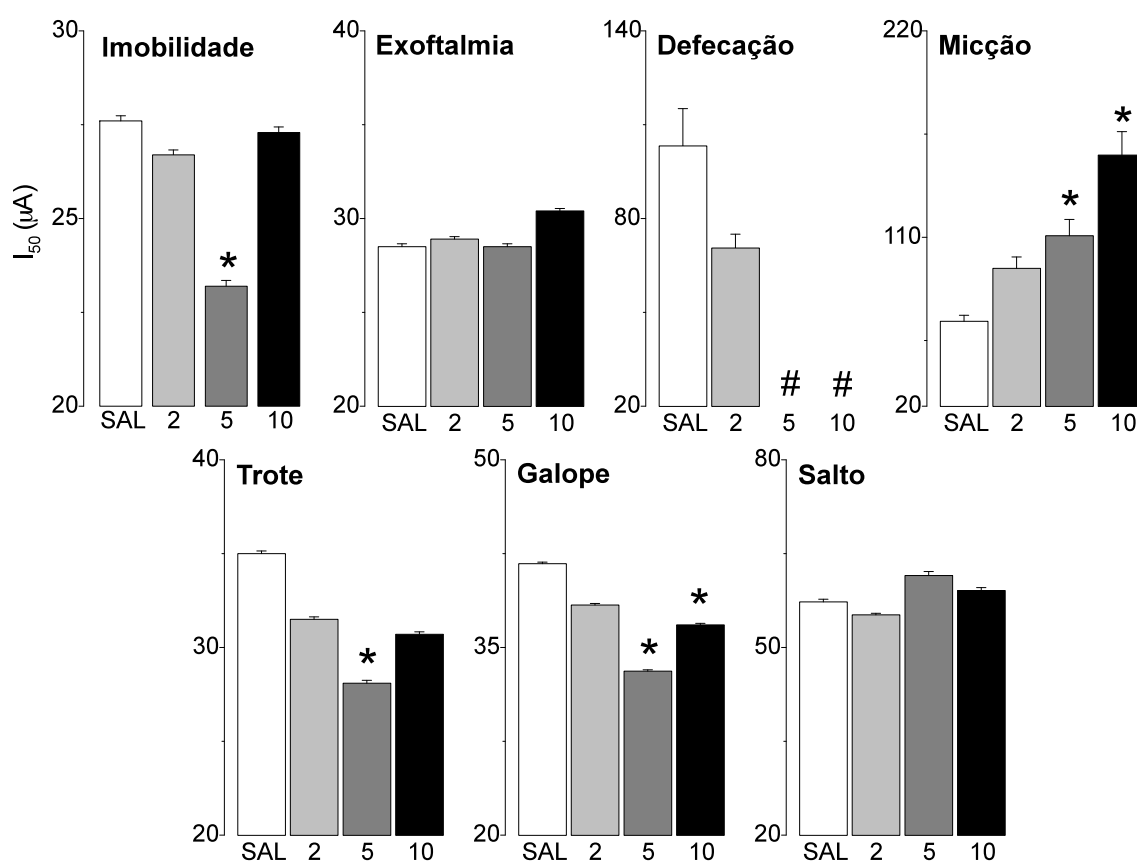


Figura 4- Efeitos dos tratamentos periféricos com IO (2, 5 e 10 mg/kg) e salina (SAL) sobre as intensidades medianas ( $\pm 95\%$ IC) das respostas de defesa induzidas por estimulação elétrica da MCPD. #  $I_{50}$  não estimável devido a frequência reduzida de resposta. \*  $P < 0,05$ , diferenças significantes em relação a salina (teste do  $\chi^2$  da razão de verossimilhanças para locação de curvas paralelas, critério de Bonferroni).

*Administração de IO na MCPD.* A administração de IO na MCPD produziu o aumento significativo do limiar de defecação ( $\Delta I_{50} = 34\%$ ;  $P < 0,0001$ ). Aumentos pequenos, porém significantes, também foram observados para os limiares de imobilidade ( $\Delta I_{50} = 9\%$ ;  $P < 0,05$ ) e trote ( $\Delta I_{50} = 14\%$ ;  $P < 0,001$ ) (Fig. 5, Tabela 2). Em contraste, os limiares de micção foram reduzidos pela IO ( $\Delta I_{50} = -25,6\%$ ;  $P < 0,0001$ ). A IO não causou alterações significantes nos limiares de exoftalmia, galope e salto.

Tabela 2- Efeitos da administração de IO na MCPD sobre os limiares medianos ( $I_{50 \pm EP}$ ,  $\mu A$ ) das respostas de defesa induzidas por estimulação elétrica do mesmo sítio. \*  $P < 0,05$  \*\*  $P < 0,001$  \*\*\* $P < 0,0001$ ), diferenças significantes em relação à salina.

	Salina	Ioimbina
Exoftalmia	$36,6 \pm 0,2$	$38,5 \pm 0,3$
Imobilidade	$39,5 \pm 0,2$	$43,1 \pm 0,2^*$
Trote	$47,9 \pm 0,1$	$54,6 \pm 0,2^{**}$
Galope	$57,5 \pm 0,2$	$61,0 \pm 0,2$
Salto	$68,0 \pm 0,1$	$70,4 \pm 0,1$
Micção	$83,6 \pm 1,0$	$62,2 \pm 0,2^{***}$
Defecação	$63,2 \pm 0,6$	$84,5 \pm 1,5^{***}$

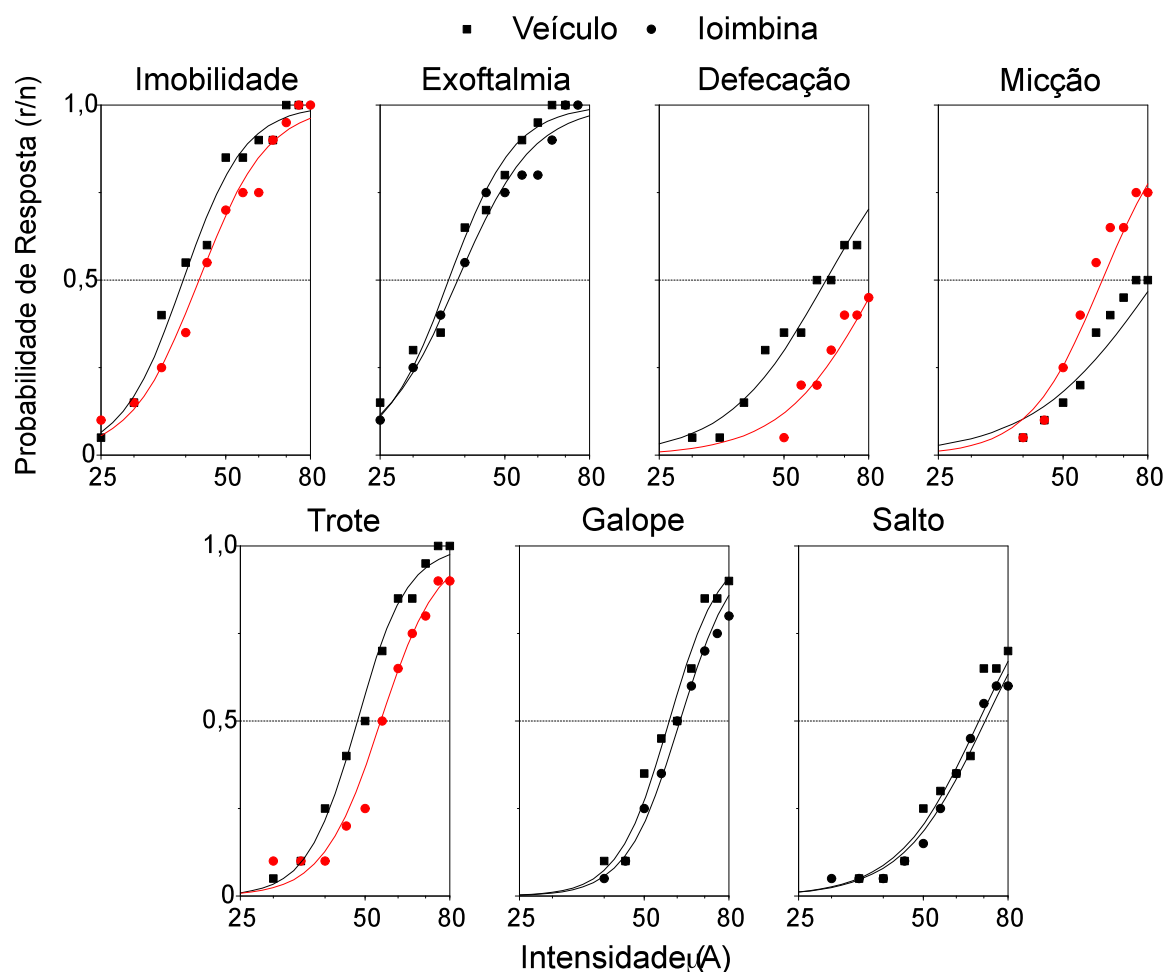


Figura 5- Efeitos da administração na MCPD de ioimbina (0,275 nmol/150 nl) ou veículo sobre os limiares das respostas de defesa induzidas por estimulação elétrica da MCPD. As linhas e os símbolos vermelhos indicam as diferenças significantes em relação à sessão com veículo ( $P < 0,05$ ; teste do  $\chi^2$  da razão de verossimilhanças). Demais detalhes como na Figura 3.

Tabela 3- Efeitos da administração de IO nas áreas CG1/CG2 sobre os limiares medianos ( $I_{50 \pm EP}$ ,  $\mu A$ ) das respostas de defesa induzidas por estimulação elétrica da MCPD. \*  $P < 0,05$  \*\*  $P < 0,01$ , diferenças significantes em relação salina ( $\chi^2$  da razão de verossimilhança, critério de Bonferroni).

	Salina	loimbina
Exoftalmia	$27,0 \pm 0,2$	$25,8 \pm 0,2$
Imobilidade	$29,6 \pm 0,3$	$30,8 \pm 0,2$
Trote	$34,5 \pm 0,2$	$35,5 \pm 0,1$
Galope	$39,0 \pm 0,2$	$41,3 \pm 0,2$
Salto	$62,5 \pm 1,2$	$70,2 \pm 0,9$
Micção	$55,2 \pm 0,5$	$73,9 \pm 3,3^{**}$
Defecação	$62,7 \pm 2,1$	$93,5 \pm 9,9^*$

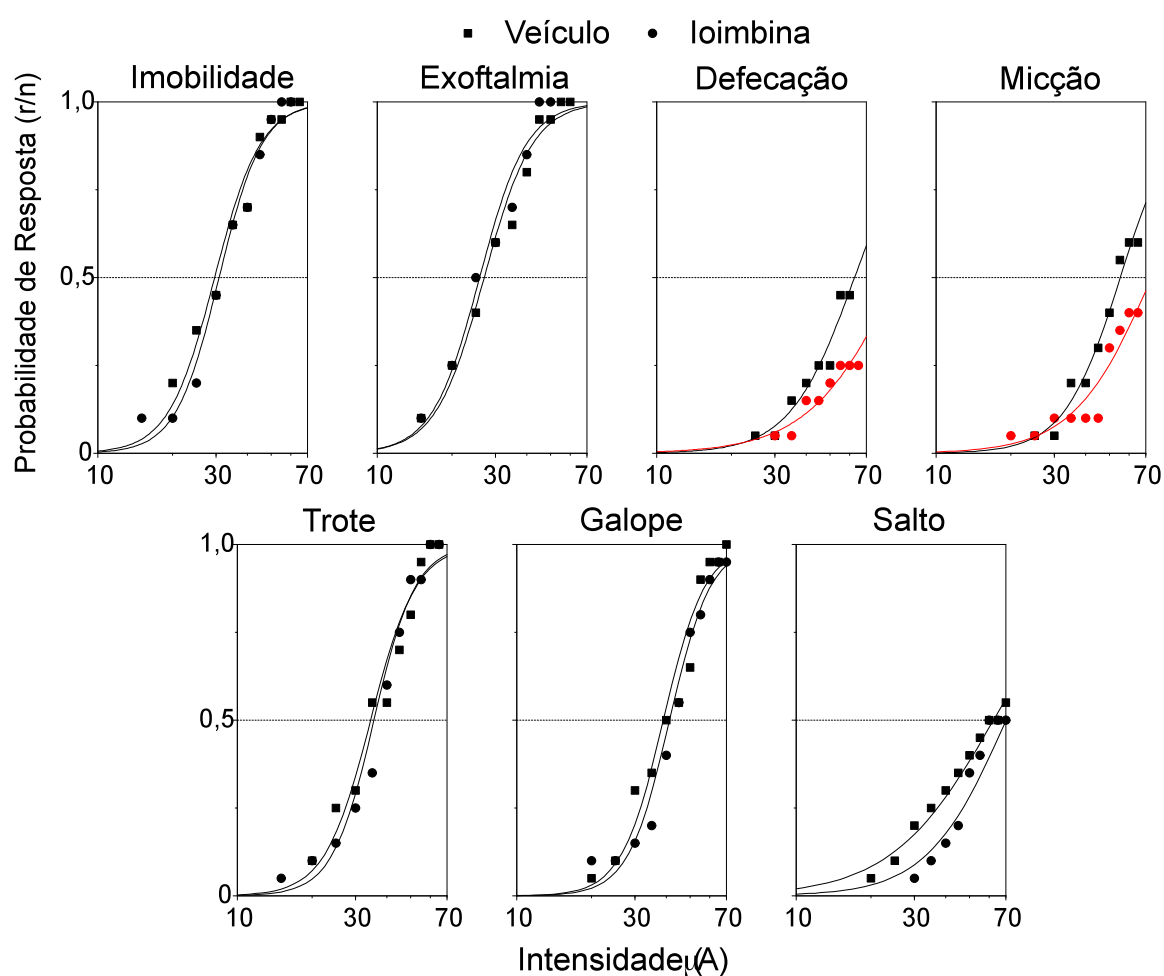


Figura 6- Efeitos da administração de IO ou veículo nas áreas CG1/CG2 (0,071 nmol /150 nl) sobre os limiares das respostas de defesa induzidas por estimulação elétrica da MCPD. Detalhes como na Figura 5.

*Efeitos da administração de ioimbina em CG1/CG2.* Exceto pelo aumento dos limiares de defecação ( $\Delta I_{50} = 49,1\%$ ;  $P < 0,05$ ) e micção ( $\Delta I_{50} = 33,8\%$ ;  $P < 0,01$ ), a administração de IO em CG1/CG2 não produziu alterações significantes nos comportamentos de defesa eliciados pela estimulação da MCPD (Fig. 6, Tabela 3).

#### **4. DISCUSSÃO**

A administração periférica de IO facilitou as respostas de imobilidade, trote e galope. Como os efeitos mais pronunciados foram observados com 5 mg/kg, os efeitos menores da dose de 10 mg/kg podem ter sido devidos a um bloqueio já significativo dos receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos. Embora a dose eficaz do presente estudo seja maior que a dose panicogênica em humanos (0,4 mg/kg) (Charney et al., 1992), ela é menor que a dose de 10 mg/kg que facilitou a resposta de galope induzida pela estimulação da MCPD de ratos numa caixa de vaivém (*shuttle-box*) (Jenck et al., 1995).

A microinjeção de IO na MCPD atenuou as respostas de imobilidade, trote e defecação, mas teve efeitos facilitatórios sobre a micção. Os efeitos opostos da IO sistêmica e local sobre a imobilidade e trote, bem como a ausência de efeitos da IO local sobre a resposta de galope, sugerem a mediação dos efeitos sistêmicos por áreas distintas da MCPD. De fato, estudos neuroanatômicos de Herbert e Saper (1992) mostraram que as projeções cerúleo-periaquedutais terminam principalmente na metade ventral da MCPA. Assim, a ausência de efeitos da microinjeção de IO na MCPD deve-se, principalmente, à escassez de terminais e/ou receptores adrenérgicos nesta região. Por outro lado, é importante notar que embora a dose central de IO tenha sido proporcional à dose periférica de 5 mg/kg, a dose central foi



certamente maior em vista da ausência do metabolismo de primeira passagem e da ligação às proteínas plasmáticas. Como a microinjeção de IO em CG1/CG2 não teve efeito algum nos limiares das respostas de imobilidade, trote e galope, a facilitação destas respostas pela administração sistêmica de IO foi provavelmente devida ao aumento da atividade do LC resultante do bloqueio dos autoreceptores inibitórios  $\alpha_2$ -adrenérgicos.

A facilitação das respostas fuga (trote e galope) pela IO corrobora os efeitos ansiogênicos e panicogênicos desta droga em humanos (Charney *et al.*, 1987, 1990, 1992; Bremner *et al.*, 1996). Por outro lado, dentre as várias respostas induzidas pela estimulação da MCPD, Schenberg e colaboradores (2001) sugerem que o galope seja o melhor modelo des ataque de pânico. De fato, estes autores mostraram que a administração crônica de doses clínicas de fluoxetina (FLX), um inibidor seletivo da recaptação de serotonina (ISRS) com ações panicolíticas estabelecidas, causa a inibição acentuada e seletiva do galope induzido por estimulação da MCPD. Embora a FLX seja um ISRS, estes resultados não afastam a possibilidade da interação entre sistemas monoaminérgicos. De fato, Gilmor e colaboradores (2002) mostraram que a paroxetina, um ISRS, reduz a taxa de renovação de NA. Adicionalmente, a administração crônica de clomipramina, um panicolítico tricíclico que é um ISRS, mas cujo metabólito inibe a recaptação de NA, produziu o aumento dos limiares de todas as respostas de defesa da MCPD (Schenberg *et al.*, 2001). Em todo caso, os efeitos mais pronunciados da IO sobre a resposta de galope sugerem que os ataques de pânico também sejam modulados por receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos.

Embora os estudos eletrofisiológicos em ratos anestesiados não tenham revelado projeções diretas da MCPD aos corpos celulares do LC, eles

não excluem projeções para os dendritos rostrais deste núcleo (Ennis et al., 1991). De fato, estudos de imunoreatividade da proteína de c-fos mostraram que a MCPD envia projeções excitatórias ao LC (Sandkuhler et al., 1991; Sandkuler e Herdegen, 1995). Por sua vez, o LC projeta-se para todo o neocórtex, incluindo as áreas do giro cingulado (Nieuwenhuys, 1985) e córtex pré-frontal que estão relacionadas às respostas atencionais do rato (Arnsten et al., 1996). Por outro lado, estudos de Floyd e colaboradores (2000) mostraram que a MCPD recebe aferências do córtex prefrontal orbitomedial, em particular, do distrito caudal da área pré-límbica e do giro cingulado anterior dorsal e ventral (CG1/CG2). Como o giro cingulado anterior parece estar envolvido na ‘atenção para a ação’ (Devinsky et al., 1995; Posner, 1995), Schenberg e colaboradores (2005) sugeriram que as projeções da MCPD ao LC, e deste a áreas do córtex prefrontal que enviam projeções descendentes à MCPD, compõem um circuito mesencéfalo-cerúleo-cortical relacionado aos componentes atencionais das respostas de defesa.

Conforme mencionamos, a administração crônica de maprotilina (MPT), um antidepressivo tetracíclico que carece de propriedades panicolíticas relevantes, produziu a atenuação acentuada e seletiva da resposta de imobilidade produzida pela estimulação da MCPD (Schenberg et al., 2001). Por sua vez, a administração central de MPT atenuou todas as respostas de defesa, exceto o salto e a micção (Lugon, 2006). A administração intracerebroventricular de DSP-4, um depletor seletivo do feixe noradrenérgico dorsal, teve efeitos ainda mais acentuados, atenuando todas as respostas de defesa 6 e 24 h após sua administração (Lugon, 2006). Não obstante, a microinjeção de IO em CG1/CG2 não produziu efeito algum nem nos comportamentos supostamente associados à atenção (imobilidade e

exoftalmia), nem nas respostas de fuga (trote, galope e saltos). Portanto, nossos resultados sugerem que os receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos das áreas CG1/CG2 não estão envolvidos nos efeitos de drogas noradrenérgicas (IO, MPT, DSP4) sobre os comportamentos de defesa induzidos por estimulação da MCPD.

Concluindo, a facilitação das respostas somáticas de defesa pela administração periférica de IO corrobora o modelo de ataque de pânico por estimulação da MCPD. A ausência de efeitos dos tratamentos locais na MCPD e em CG1/CG2 sugere que os efeitos pró-pânico da IO sejam mediados por outras áreas, possivelmente, o próprio LC.

## **ESTUDO II**

**EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO PERIFÉRICA DE  
CLONIDINA SOBRE OS LIMIARES DAS  
RESPOSTAS DE DEFESA INDUZIDAS PELA  
ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DA MATÉRIA  
CINZENTA PERIAQUEDUTAL DORSAL DE RATOS.**

## RESUMO

As anormalidades do sistema noradrenérgico têm sido propostas como fatores causais ou predisponentes dos transtornos de ansiedade, inclusive, do transtorno de pânico. Por outro lado, as respostas defensivas produzidas por estimulação elétrica ou química da matéria cinzenta periaquedutal dorsal (MCPD) de ratos têm sido propostas como um modelo de ataque de pânico. Estudos recentes do nosso laboratório mostraram que a administração periférica do antagonista de receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos, ioimbina (IO), facilitou as respostas imobilidade, trote e galope, eliciadas pela estimulação elétrica da MCPD. Em particular, a facilitação do galope mimetiza os efeitos panicogênicos da IO em humanos. Em contraste, a clonidina (CLO) é um agonista  $\alpha_2$ -adrenérgico que apresenta efeitos panicolíticos transientes. Portanto, este estudo examinou os efeitos da administração de CLO (1, 2, 4, 8  $\mu\text{g/kg}$ , i.p.) ou veículo sobre os limiares das respostas de defesa eliciadas por estimulação elétrica da MCPD de ratos ( $n=20$ ). Os tratamentos foram realizados em ordem balanceada, em intervalos de 48 h. Os efeitos sobre os limiares de defesa foram avaliados por análise logística de limiares e comparados por testes de razão de verossimilhanças ( $P<0,05$ ). Comparados ao grupo controle, os ratos tratados com CLO apresentaram uma atenuação significativa da resposta de salto nas doses de 4 e 8  $\mu\text{g/kg}$  e uma atenuação marginal do galope na dose de 4  $\mu\text{g/kg}$ . Em contraste, a defecação foi facilitada pela dose de 2  $\mu\text{g/kg}$ . Embora estes resultados sejam limitados, a atenuação seletiva das respostas de salto e galope corrobora o modelo de pânico por estimulação da MCPD.

**Palavras-chave:** Ataque de Pânico, Matéria Cinzenta Periaquedutal, Clonidina, Receptores Alfa<sub>2</sub>-noradrenérgicos, Estimulação Elétrica.

## Introdução

Vários estudos sugerem que o sistema noradrenérgico esteja envolvido na mediação da ansiedade (Charney et al., 1984, 1987, 1992; Liebowitz et al., 1981). Em particular, o locus cerúleo (LC), principal núcleo noradrenérgico, foi proposto como uma estrutura crucial na produção de ansiedade. A primeira evidência da relação do sistema noradrenérgico com ansiedade e medo baseou-se na observação de que a estimulação elétrica do LC de ‘macacos do rabo curto’ (*stump-tailed monkey*, *Macaca arctoides*) produzia respostas comportamentais similares às respostas de medo desta espécie na natureza ou no laboratório (Redmond et al., 1979).

Por outro lado, pacientes com transtorno de pânico (TP) apresentam ataques espontâneos de pânico, ansiedade antecipatória e agorafobia (DSM-IV, 2000). A estimulação elétrica da metade dorsal da matéria cinzenta periaquedutal (MCPD) de voluntários sadios provoca reações emocionais similares aos ataques espontâneos de pânico (Nashold *et al.*, 1969). Adicionalmente, as respostas defensivas produzidas por estimulação elétrica ou química da MCPD de ratos foi proposta como um modelo de ataque de pânico (Gentil, 1988; Deakin e Graeff, 1991; Jenck et al., 1995; Schenberg et al., 2001; Vargas e Schenberg, 2001). Em ratos, a estimulação da MCPD produz a reação de congelamento (imobilidade e exoftalmia) nas menores intensidades, e comportamentos de fuga (trote, galope e salto) nas intensidades mais elevadas (Bittencourt et al., 2004). Dentre estas respostas, o galope tem sido sugerido como o modelo mais adequado dos ataques de pânico (Vargas e Schenberg, 2001; Schenberg et al., 2001), já que esta resposta é seletivamente atenuada pelo inibidor seletivo da recaptação de

serotonina (ISRS), fluoxetina, em doses e regimes similares aos empregados na terapia do TP.

Em estudo anterior, mostramos que a administração periférica do antagonista  $\alpha_2$ -adrenérgico IO (5 mg/kg) facilita as respostas de imobilidade, defecação, trote e galope eliciadas pela estimulação elétrica da MCPD, mas atenua a resposta de micção, mimetizando as ações panicogênicas deste agente em humanos (Charney *et al.*, 1987, 1990, 1992; Bremner *et al.*, 1996). Estes efeitos sugerem a participação dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos na modulação das respostas de defesa produzidas por estimulação elétrica da MCPD.

A clonidina (CLO) é um agonista  $\alpha_2$ -adrenérgico (Abercrombie e Jacobs, 1987), indicada principalmente para hipertensão, mas também como um bloqueador dos sintomas de abstinência de opióides e como ansiolítico (Svensson *et al.*, 1978). Estudos com pacientes com TP mostraram que a CLO tem um efeito panicolítico rápido, porém transiente (Liebowitz *et al.*, 1981). Portanto, o presente estudo analisou os efeitos da administração periférica de CLO nas respostas de defesa produzidas pela estimulação elétrica da MCPD de ratos.

## 1. MATERIAL E MÉTODOS

*Animais:* Foram utilizados 60 ratos albinos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), machos, pesando entre 250 e 300 g, fornecidos pelo biotério da Universidade Federal do Espírito Santo. Os animais eram alojados em gaiolas individuais com paredes de vidro (25 x 15 x 30 cm) e assoalho coberto por maravalha. Os ratos tinham livre acesso à água e comida e eram mantidos em ambiente com ciclo de iluminação de 12 h (luzes acessas às 6:00 h) e temperatura controlada

(20-25 °C). Os experimentos e cuidados com os animais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais desta universidade (CEUA-UFES).

*Eletrodos:* Os eletrodos eram confeccionados com um fio de aço inoxidável (Califórnia Fine Wire Company, Grover City, EUA) de 250 µm de diâmetro, isolado em toda extensão exceto na seção transversal. Um outro fio de aço inoxidável, não isolado, servia como eletrodo indiferente. Os eletrodos eram soldados a um soquete de circuito integrado (Celis, BCPT, São Paulo, SP, Brasil).

*Cirurgia:* Os animais eram anestesiados com 400 mg/kg (i.p.) de hidrato de cloral (Isofar, Rio de Janeiro, Brasil) e fixados ao aparelho estereotáxico (David Kopf, Tujunga, EUA) com bregma e lambda no mesmo plano horizontal. Em seguida, realizava-se uma tricotomia da parte superior da cabeça e uma pequena área oval da pele e tecidos subcutâneos eram removidos, expondo-se a calota craniana à altura do lambda. Após a limpeza e secagem do campo, fazia-se 5 orifícios com o auxílio de uma broca odontológica, sendo 2 em cada osso parietal e 1 na extremidade caudal do osso interparietal; que serviam para a introdução de pequenos parafusos de aço inoxidável e fixação da prótese cirúrgica. Realizava-se a trepanação da região do lambda com uma broca adiamantada (KG Sorensen 1016), expondo-se o cérebro à altura do seio venoso. O centro presumido da confluência dos seios sagital e posterior era utilizado como referência para a introdução do eletrodo. Durante a implantação, utilizava-se uma agulha hipodérmica para perfurar a dura-máter e afastar o seio venoso, evitando o seu rompimento. O eletrodo era introduzido em direção à região dorsolateral da matéria cinzenta periaquedutal, de acordo com as



seguintes coordenadas AP 7,4 mm e LAT 0,4 mm em relação ao bregma, e VERT 4,8 mm a partir da superfície do seio venoso. Após a implantação do eletrodo ativo, o eletrodo indiferente era soldado a um dos parafusos e o campo cirúrgico era preenchido com resina autopolimerizável (JET, São Paulo, Brasil), formando uma prótese sólida. Um tubo plástico, de 1,0 cm de altura e 1,5 cm de diâmetro era fixado com resina ao redor do eletrodo, protegendo-o de danos eventuais. Ao término da cirurgia os animais recebiam tratamento com 24.000 UI de penicilina-G benzatina (i.m.) e eram mantidos em placa aquecida à 30 °C até a recuperação anestésica plena.

*Estimulação elétrica intracraniana:* Cinco dias após a cirurgia, os ratos (n=20) eram submetidos à sessão-triagem de estimulação. Os ratos eram conectados a um estimulador de corrente constante de pulso senoidal (FDV, Ribeirão Preto, Brasil) por meio de um cabo leve e flexível acoplado a um conector giratório de mercúrio e colocados numa arena de acrílico transparente (*open-field*) de 60 cm de diâmetro e altura. Após um período de 30 min de habituação os ratos eram estimulados com pulsos senoidais (0-60  $\mu$ A, 60 Hz, 30 s) de intensidades crescentes em passos de 5  $\mu$ A, aplicados em intervalos de 3 a 5 min e monitorados por um osciloscópio (V-121 Hitachi-Denshi, Malásia). Os comportamentos produzidos pela estimulação eram registrados de acordo com um etograma descrito em estudos anteriores (Schenberg *et al.*, 2001; Vargas *et al.*, 2001; Schenberg *et al.*, 2002, Bittencourt *et al.*, 2004; 2005). As respostas eram registradas de modo binário, ou seja, como ‘emitidas’ ou ‘não’, independentemente de sua frequência ou duração durante o período de

estimulação. Os experimentos eram conduzidos num ambiente com som atenuado e temperatura controlada (23-25 °C).

*Administração de Clonidina:* Os ratos que na sessão-triagem exibiram o galope com intensidades inferiores a 60  $\mu$ A eram selecionados para os tratamentos com salina ou CLO. Cada rato foi submetido a 5 sessões de estimulação, em intervalos de 48 h. Nestas, o rato era tratado com salina ou 1, 2, 4 e 8  $\mu$ g/kg de CLO (hidroclorato de clonidina, Sigma, St Louis, EUA), administrados segundo ordem aleatória mas balanceada e, 30 min após, era estimulado eletricamente.

*Análise histológica:* Ao término do experimento os ratos eram anestesiados com 1,5 dose anestésica de hidrato de cloral (600 mg/kg, i.p.), fixados a uma plataforma de perfusão e submetidos a uma toracotomia. Após a exposição do coração e da ligadura da aorta descendente, introduzia-se uma agulha no ventrículo esquerdo. Em seguida, o átrio direito era seccionado e realizava-se a perfusão com 200 ml de solução salina (NaCl 0,9 %) e 200 ml de solução de formaldeído (10 %) com o auxílio de uma bomba peristáltica (Masterflex CE 77120-70, Barrington, EUA). As cabeças eram mantidas por cerca de 10 dias em solução de formaldeído (10 %) para ‘moldar’ o trato do eletrodo e, em seguida, os cérebros eram retirados das caixas cranianas e mantidos por 2 dias adicionais em formaldeído. Por fim, os cérebros eram preparados em blocos do mesencéfalo e seccionados num micrótomo de congelamento (Jung AG, Heidelberg, Alemanha) em cortes de 40  $\mu$ m de espessura. Os cortes eram estendidos em lâminas gelatinizadas, desidratados, corados com vermelho neutro (Sigma, EUA) e montados com DPX (Aldrich Chemical Company, EUA). Os sítios das estimulações foram identificados por lupa (Olympus Optical-SZ40,

Japão), fotografados (Samsung-SDC415ND, Coréia), e registrados em diagramas coronais do atlas do cérebro do rato de Paxinos e Watson (1998).

*Análise estatística:* As curvas de probabilidade de resposta foram obtidas pelo ajuste logístico das frequências acumuladas das respostas limiares em função do logarítmo da intensidade de corrente para cada dose de CLO (ou para a salina), de acordo com o modelo:

$$P(y_{ij}|x_{ij}) = [1 + \exp(-(\alpha_j + \beta_j x_{ij}))]^{-1}$$

Onde:  $P$  é a probabilidade esperada da resposta  $y_{ij}$  para um dado estímulo  $x_{ij}$ ,  $\alpha_j$  é o intercepto e  $\beta_j$  a inclinação da *jésima* curva de intensidade-resposta das doses de CLO. Ajustes logísticos significantes foram avaliados pelo  $\chi^2$  de Wald ( $\chi^2_w = [\beta/EP]^2$ ), onde EP é o erro padrão de  $\beta_j$ . As curvas intensidade-resposta dos tratamentos farmacológicos foram parametrizadas por meio de variáveis indicadoras (0 e 1) e comparadas pela diferença dos desvios de verossimilhança do modelo completo ( $k$  parâmetros) e dos modelos reduzidos ( $k-r$  parâmetros), proporcionando valores de  $\chi^2$  com  $r$  graus de liberdade ( $\chi^2_r$ ) das comparações para locação ou paralelismo das regressões. Os  $\chi^2_r$  dos testes gerais de locação e paralelismo, assim como o  $\chi^2$  de Wald, foram considerados significantes ao nível de 5 %. Os  $\chi^2_r$  dos testes pareados de locação e paralelismo (1 g.l.) foram considerados significantes segundo o critério de 5 % de Bonferroni. O ajuste por máxima verossimilhança foi realizado pelo procedimento “Logistic” do programa SAS (SAS®, Cary, EUA). As medianas ( $I_{50}$ ) assim como os respectivos erros padrões (EP) e o intervalo de confiança (IC 95 %) foram computados para um modelo de curvas paralelas pelas fórmulas que se seguem:

$$\text{Log}(I_{50}) = \alpha/\beta$$

$$I_{50} = 10^{-\alpha/\beta}$$

$$EP\{\text{Log}(I_{50})\} = \{[\text{Var}(\alpha) - 2(\alpha/\beta)\text{Cov}(\alpha, \beta) + (\alpha/\beta)^2 \text{Var}(\beta)]/\beta^2\}^{1/2}$$

$$EP(M_{50}) = I_{50}\{EP[\text{Log}(I_{50})]\}$$

$$IC95\%(I_{50}) = I_{50} \pm 1,96\{EP(I_{50})\}$$

Onde, as variâncias (Var) e covariâncias (Cov) dos parâmetros foram obtidas pela matriz estimada de covariância do procedimento Logistic. A descrição detalhada destes métodos pode ser encontrada em Collett (2003).

### 3. RESULTADOS

*Análise Histológica:* Os ratos foram majoritariamente (80%) estimulados na MCPD. Os outros eletrodos localizaram-se nas camadas profundas do colículo superior. Os eletrodos encontrados na MCPA estavam igualmente distribuídos entre a MCPAd e MCPAl (Fig. 1).

*Efeitos da Clonidina:* As curvas de limiar diferenciam significativamente para as respostas de defecação ( $\chi^2 = 27$ ; g.l. = 4;  $P < 0,0001$ ), galope ( $\chi^2 = 20$ ; g.l. = 4;  $P < 0,0005$ ) e salto ( $\chi^2 = 17,5$ ; g.l. = 4;  $P < 0,001$ ). Diferenças marginais também foram observadas para a resposta de trote ( $\chi^2 = 7,8$ ; g.l. = 4;  $P < 0,09$ ) (Figs. 2-3, Tabela 1). Comparados aos efeitos da salina, os limiares da resposta de salto foram aumentados nas doses de 4 µg/kg ( $\Delta I_{50} = 29\%$ ;  $\chi^2 = 9,5$ ; g.l. = 1;  $P < 0,002$ ) e 8 µg/kg ( $\Delta I_{50} = 26\%$ ;  $\chi^2 = 7,2$ ; g.l. = 1;  $P < 0,01$ ). Também foi observado um aumento marginal do limiar de galope na dose de 4 µg/kg ( $\Delta I_{50} = 11\%$ ;  $\chi^2 = 5,3$ ; g.l. = 1;  $P < 0,02$ ). Este, no entanto, não alcançou o critério de 5% de Bonferroni. Em contraste, os limiares da resposta de defecação foram reduzidos na dose de 2 µg/kg ( $\Delta I_{50} = -28,4\%$ ;  $\chi^2 = 6,7$ ; g.l. = 1;  $P < 0,01$ ).

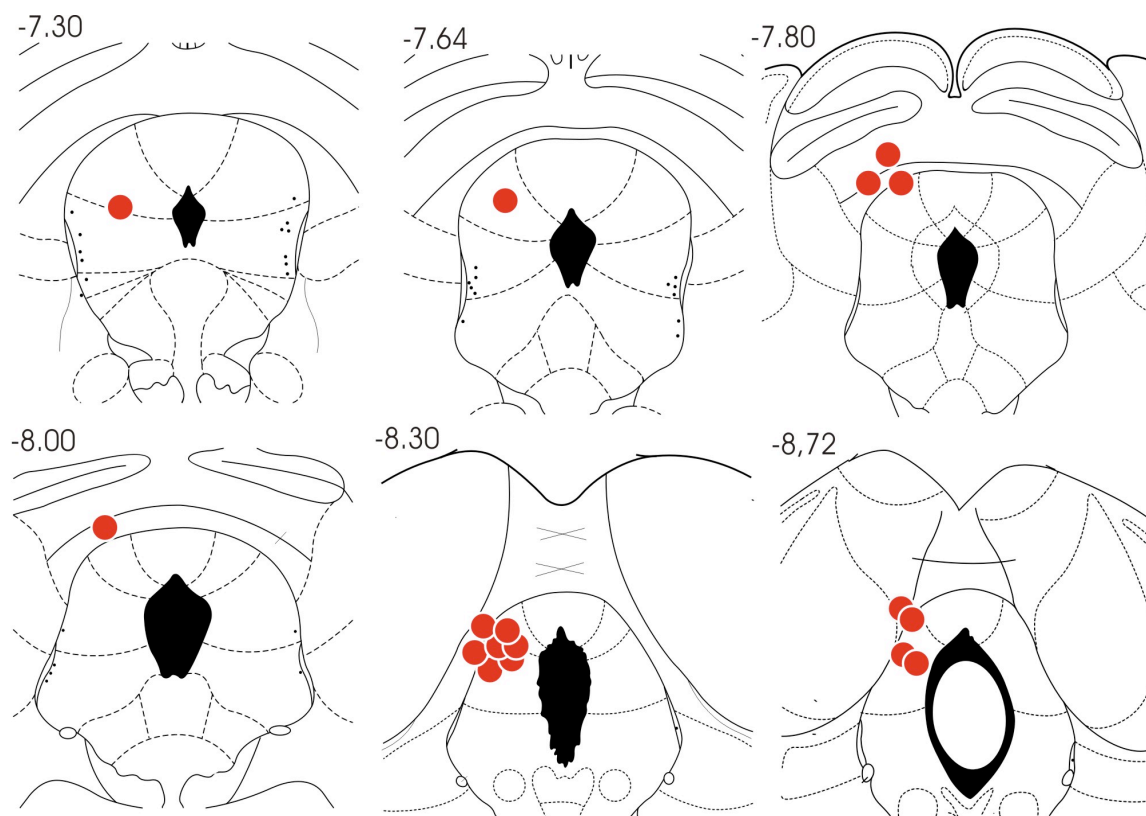


Figura 1- Sítios de estimulação elétrica dos ratos tratados com CLO por via sistêmica (círculos sólidos). Os diagramas foram extraídos do atlas do cérebro de ratos de Paxinos e Watson (1986). Os números representam as coordenadas antero-posteriores em relação ao bregma.

Tabela 1. Efeitos da administração periférica de clonidina sobre os limiares medianos ( $I_{50 \pm EP}$   $\mu A$ ) das respostas de defesa induzidas por estimulação elétrica da MCPD. \*  $P < 0,01$ , diferenças significantes em relação salina ( $\chi^2$  da razão de verossimilhança, critério de Bonferroni). EXO - exoftalmia, IMO - imobilidade, TRT - trote, GLP - galope, SLT - salto, MIC - micção, DEF - defecação.

	Salina	Clonidina ( $\mu g/kg$ )			
		1	2	4	8
EXO	$30,3 \pm 0,2$	$28,8 \pm 0,2$	$30,1 \pm 0,2$	$33,4 \pm 0,2$	$31,0 \pm 0,2$
IMO	$35,0 \pm 0,1$	$33,1 \pm 0,2$	$33,6 \pm 0,2$	$36,9 \pm 0,2$	$33,7 \pm 0,2$
TRT	$42,2 \pm 0,2$	$39,7 \pm 0,2$	$39,7 \pm 0,2$	$45,1 \pm 0,2$	$42,6 \pm 0,2$
GLP	$51,6 \pm 0,1$	$49,0 \pm 0,1$	$46,2 \pm 0,2$	$57,0 \pm 0,2$	$49,8 \pm 0,2$
SLT	$77,2 \pm 0,8$	$80,1 \pm 0,8$	$77,3 \pm 0,6$	$99,9 \pm 1,7^*$	$96,9 \pm 1,4^*$
MIC	$58,9 \pm 0,1$	$54,6 \pm 0,0$	$52,9 \pm 0,2$	$57,9 \pm 0,1$	$54,6 \pm 0,0$
DEF	$115,9 \pm 3,8$	$101,1 \pm 2,5$	$83,0 \pm 1,8^*$	$106,4 \pm 3,0$	$152,1 \pm 5,7$

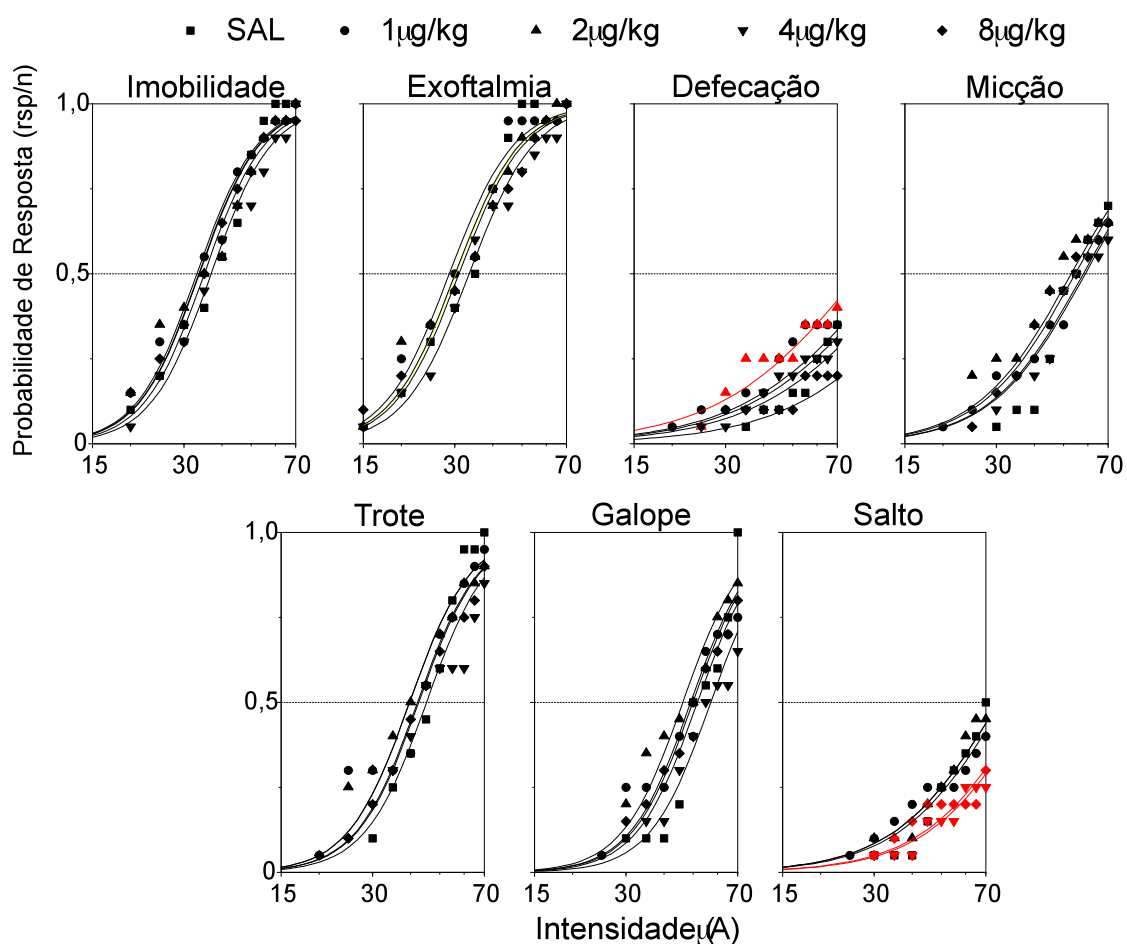


Figura 2- Efeitos da administração periférica de CLO (0, 1, 2, 4 e 8  $\mu\text{g/kg}$ ; i.p.) sobre os limiares das respostas de defesa induzidas por estimulação elétrica da MCPD. As curvas intensidade-resposta representam foram ajustadas segundo o modelo logístico para curvas paralelas. r - número de animais que apresentaram a resposta, n - número total de ratos estimulados. As linhas e os símbolos vermelhos indicam as diferenças significantes em relação à sessão com salina (critério de 5% de Bonferroni do teste do  $\chi^2$  da razão de verossimilhanças para locação num modelo de curvas paralelas).

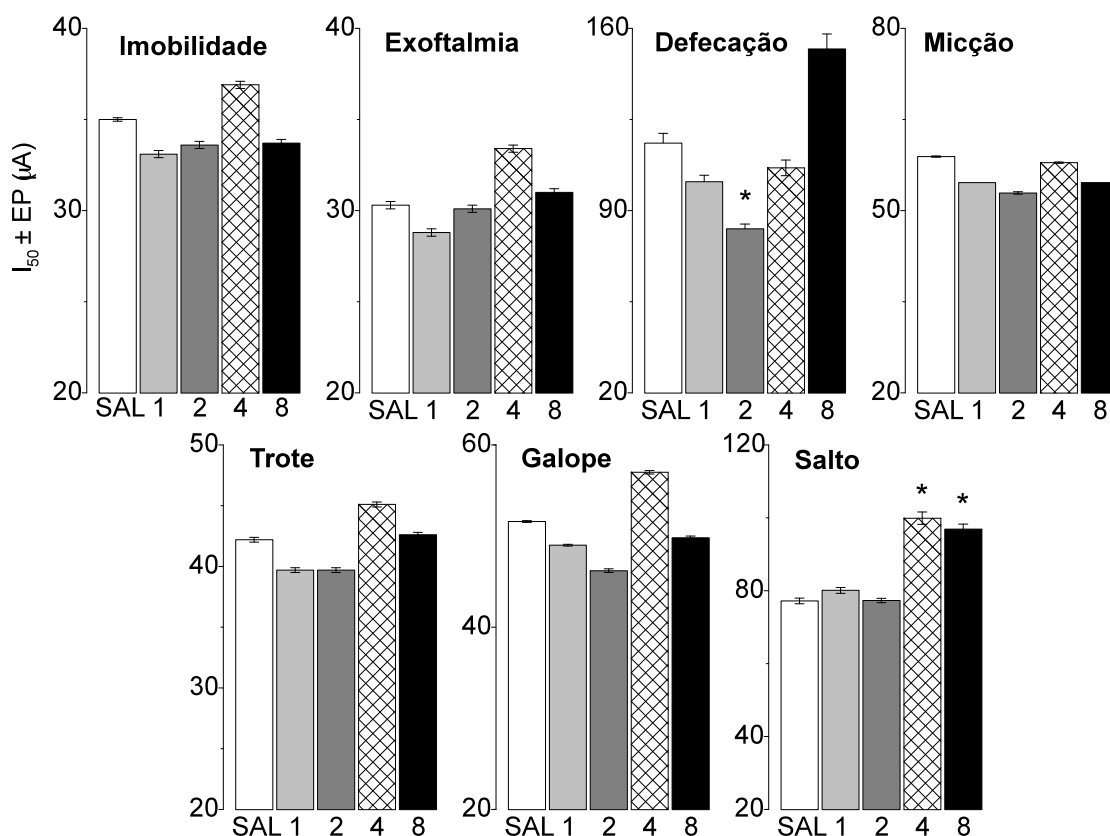


Figura 3- Efeitos da administração periférica de CLO (1, 2, 5 e 8 µg/kg) ou salina (SAL) sobre as intensidades medianas ( $I_{50} \pm 1,96EP$ ) das respostas de defesa induzidas por estimulação elétrica da MCPD. \*  $P < 0,05$ , diferenças significantes em relação a salina (critério de Bonferroni para o teste do  $\chi^2$  da razão de verossimilhanças para locação no modelo de curvas paralelas).

#### 4. DISCUSSÃO

A administração periférica de CLO causou aumentos significantes nos limiares da resposta de salto, nas doses de 4 µg/kg e 8 µg/kg, mas uma elevação apenas marginal dos limiares de galope, na dose de 4 µg/kg. Em contraste, a CLO facilitou a defecação na dose de 2 µg/kg. Estes efeitos foram observados com doses similares às utilizadas em humanos (2-14 µg/kg) (Charney et al., 1992; Liebowitz et al., 1981).

Estudos anteriores mostraram que a administração periférica da IO, um antagonista dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos, facilita o galope da resposta de

fuga na caixa de vaivém (Jenck et al., 1995) e os comportamentos de imobilidade, trote e galope induzidos pela estimulação da MCPD de ratos (Müller, 2010). Em particular, os efeitos facilitatórios mais pronunciados foram observados para a resposta de galope que, presumivelmente, é o melhor representante dos ataques de pânico (Schenberg et al., 2001; Vargas et al., 2001). Contudo, a IO não facilitou a resposta de salto, como seria esperado com base nos resultados da CLO. Adicionalmente, enquanto o galope foi o comportamento mais sensível à IO, ele sofreu uma atenuação apenas marginal após a administração de CLO. A razão destas discrepâncias pode estar na dinâmica do repertório de defesa, qual seja, a CLO pode ter deslocado o repertório defensivo do rato em direção às respostas de menor limiar que são ativadas em situações de menor risco (Blanchard et al., 1986). Se este for o caso, a atenuação da resposta de salto pode ter resultado no aumento da frequência das respostas de imobilidade, trote e galope. Um efeito similar foi observado para a administração aguda de fluoxetina, na qual a atenuação do galope foi acompanhada pela facilitação do trote (Schenberg et al., 2002). Contudo, embora a IO tenha facilitado as respostas de imobilidade, trote e galope, não houve inibição da resposta de salto, mostrando que o inverso nem sempre é verdadeiro (Müller, 2010). Em todo caso, os efeitos inibitórios da CLO sobre o salto e, em menor grau, galope, são compatíveis com os estudos com a IO e sugerem a participação dos autoreceptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos na modulação das respostas de defesa em rato e ataques de pânico em humanos.

O presente estudo também é compatível com os estudos de Lugon (2006) que mostraram que tanto a administração central (i.c.v.) de maprotilina, um inibidor seletivo da recaptação de noradrenalina (NA) que promove a inibição acentuada do LC (Ceci e Borsini, 1996), quanto de DSP-4, um depletor



seletivo do feixe noradrenérgico dorsal (Fritschy e Grzanna, 1989), causam a inibição acentuada dos comportamentos de defesa induzidos por estimulação da MCPD.

Não obstante, estimulação elétrica do LC de 4 pacientes neurológicos que produziu aumentos de 4 a 9 vezes dos níveis plasmáticos de 3-metoxi-4-hidroxi-fenilglicol (MHPG), o principal metabólito da NA, causou apenas um estado de alerta (Libet e Gleason, 1994). Estas observações estão de acordo com estudos anteriores que mostraram que a administração crônica de maprotilina produz o aumento seletivo dos limiares da resposta de imobilidade causada por estimulação da MCPD, uma resposta que parece estar associada ao aumento da atenção e, possivelmente, ansiedade antecipatória que precede os ataques de pânico (Schenberg et al., 2001). Embora os últimos estudos tornem improvável a contribuição direta do LC na aversividade dos ataques de pânico, a NA pode ter um papel tanto modulatório quanto permissivo na deflagração destes ataques, tal como sugerem os relatos de tratamentos do TP com inibidores seletivos ou preferenciais da recaptação de NA (Lydiard, 1987, Lydiard *et al.*, 1993; Kalus *et al.*, 1991; Sasson *et al.*, 1999; Versiani *et al.*, 2002; Dannon *et al.*, 2002; Seedat *et al.*, 2003; Nardi *et al.*, 2003; Bertani *et al.*, 2004).

Por fim, o presente estudo corrobora as observações em humanos que mostraram que a CLO produz efeitos panicolíticos rápidos porém transientes (Charney et al., 1992; Liebowitz et al., 1981). Assim, embora estes efeitos pudessem ter interesse clínico em pacientes de pânico com hipertensão, eles desaparecem a despeito da elevação das doses de CLO até o máximo tolerado pelos pacientes (Liebowitz et al., 1981).

## **5- REFERÊNCIAS**

- Abercrombie, E.D. e Jacobs, B.L. (1987). Microinjected clonidine inhibits noradrenergic neurons of the locus coeruleus in freely moving cats. *Neuroscience Letters* 76(2):203-208.
- Anand A, Charney DS, Norepinephrine Dysfunction in depression. 2000. *J Clin Psychiatry* 61(suppl 10): 16-24.
- Arnsten AF (2004). Adrenergic Targets for the Treatment of Cognitive Deficits in Schizophrenia. *Psychopharmacology* 174: 25-31.
- Arnsten AF, Scahill L, Findling RL (2007). Alpha<sub>2</sub>-adrenoceptor Receptor Agonists for the Treatment of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder: Emerging Concepts from New Data. *Journal of Child and Adolescent Psychopharmacology* 17(4): 393-406.
- Arnsten AFT, Steere JC, Hunt RD (1996). The Contribution of Alpha<sub>2</sub>-noradrenergic Mechanisms to Prefrontal Cortical Cognitive Function. *Arch. Gen. Psychiatry*, 53: 448-455.
- Aston-Jones G, Ennis M, Nickell WT, Shipley MT. (1986). The brain nucleus locus coeruleus: restricted afferent control of a broad efferent network. *Science*, 234: 734-737.
- Aston-Jones G, Shipley MT, Chouvet G, Ennis M, Van Bockstaele E, Pieribone V, Shiekhatair R, Akaoka H, Drolet G, Astier B, Charléty P, Valentino RJ, Williams JT. (1991). Afferent regulation of locus coeruleus neurons: anatomy, physiology and pharmacology. *Brain Research*, vol 88: 47-75.

- Aston-Jones,G., Rajkowski,J. e Cohen,J. (2000). Locus coeruleus and regulation of behavioral flexibility and attention. *Prog.Brain Res.* 126:165-182.
- Barbaccia,M.L., Ravizza,L., Costa,E., 1986. Maprotiline: an antidepressant with an unusual pharmacological profile, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 236, pp. 307-312
- Battaglia,M. e Ogliari,A. (2005). Anxiety and panic: from human studies to animal research and back. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 29(1):169-179.
- Bertani, A., Perna, G., Migliarese, G., Di Pasquale, D., Cucchi, M., Caldirola, D., e Bellodi, L. (2004). Comparison of the treatment with paroxetine and reboxetine in panic disorder: a randomized, single-blind study. *Pharmacopsychiatry*, 37, 206-210.
- Bertrand,M., 1969. The behavioural repertoire of the stump-tail macaque. S. Karger Ltd., New York.
- Bittencourt,A.S., Carobrez,A.P., Zamprogno,L.P., Tufik,S. e Schenberg,L.C. (2004). Organization of single components of defensive behaviors within distinct columns of periaqueductal gray matter of the rat: role of N-methyl-D-aspartic acid glutamate receptors. *Neuroscience* 125(1):71-89.
- Bittencourt,A.S., Nakamura-Palacios,E.M., Mauad,H., Tufik,S. e Schenberg,L.C. (2005). Organization of electrically and chemically evoked defensive behaviors within the deeper collicular layers as compared to the periaqueductal gray matter of the rat. *Neuroscience*. 133(4):873-892.

- Blanchard,R., Flannelly,K.J., Blanchard,C. (1986). Defensive behavior of laboratory and wild *Rattus norvegicus*, *J. Comp. Psychol.* 100(2): 101-107.
- Bremner,J.D., Krystal,J.H., Southwick,S.M. e Charney,D.S. (1996). Noradrenergic mechanisms in stress and anxiety: II. Clinical studies. *Synapse* 23(1):39-51.
- Bylund DB (1992). Subtypes of Alpha<sub>1</sub> and Alpha<sub>2</sub>-adrenergic Receptor. *FASEB Jornal.* 6: 832-839.
- Bylund DB, Bond RA, Bouvier M, Clarke DE, Eikenberg DC, Hieble JP, Kobilka BK, Langer SZ, Lefkowitz RJ, Minneman KP, Ruffolo RR, Strosberg AD. (2000). The Adrenoceptors in The IUPHAR Compendium of Receptors Characterization and Classification
- Bylund DB, Eikenberg DC, Hieble JP, Langer SZ, Lefkowitz RG, Minneman KP, Molinoff PB, Ruffolo Jr RR, Trendelenburg U (1994). International Union of Pharmacology Nomenclature of Adrenoceptors. *Pharmacology Review.* 46: 121-136.
- Cameron,A.A., Khan,I.A., Westlund,K.N., Willis,W.D., 1995. The efferent projections of the periaqueductal gray in the rat: a Phaseolus vulgaris leucoagglutinin study. II- Descending Projections, *J. Comp. Neurol.* 351, pp. 585-601.
- Carli M, Robbins TW, Evenden JL, Everitt BJ (1983). Effect of Lesions to Ascending Noradrenergic Neurons on Performance of a 5-choice serial Reaction Task in Rats: Implications for Theories of Dorsal Noradrenergic Bundle Function Based on Seletive Attention and Arousal. *Behavior Brain Res.* 9: 361-380.

- Ceci,A. e Borsini,F. (1996). Effects of desipramine and maprotiline on the coeruleus-cortical noradrenergic system in anaesthetized rats. *European Journal of Pharmacology* 312(2):189-193.
- Charney DS, Breier A, Jatlow PI, Heninger GR. (1986). Behavioral, biochemical, and blood pressure responses to alprazolam in healthy subjects: interactions with yohimbine. *Psychopharmacology (Berl)*. 88(2):133-40
- Charney DS, Heninger GR, Breier A. (1984). Noradrenergic Function in Panic Anxiety. Effects os Yohimbine in Healthy Subjects and Patients with Agoraphobia and Panic Disorder. *Arch. Gen. Psychiatry* 41(8): 751-763.
- Charney DS, Woods SW, Goodman WK, Heninger GR. (1987). Neurobiological Mechanisms of Panic Anxiety: Biochemical and Behavioral Correlates of Yohimbine-Induced Panic Attacks. *Am. J. Psychiatry*. 1447: 1030-1036.
- Charney DS, Woods SW, Krystal JH, Nagy LM, Heninger GR (1992). Noradrenergic Neuronal Dysregulation in Panic Disorder: The Effects of Intravenous Yohimbine and Clonidine in Panic Disorder Patients. *Acta Psychiatr. Scand*. 86: 273-282.
- Charney DS, Woods SW, Nagy LM, Southwick SM, Krystal JH, Heninger GR (1990) .Noradrenergic Fuction in Panic Disorder. *J. Clin. Psychiatry* 51 (suppl 12-A) 5-11.
- Collett D (2003). *Modelling Binary Data*, Chapman and Hall, Londres.
- Commissaris,R.L., Ellis,D.M., Hill,T.J., Schefke,D.M., Becker,C.A., Fontana,D.J., 1990. Chronic antidepressant and clonidine treatment

effects on conflict behavior in the rat, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 37, pp. 167-176.

Cooper JR, Bloom FE, Roth RH. (2003) The biochemical basis of neuropharmacology.

Coplan,J.D., Liebowitz,M.R., Gorman,J.M., Fyer,A.J., Dillon,D.J., Campeas,R.B., Davies,S.O., Martinez,J., Klein,D.F., 1992. Noradrenergic function in panic disorder. Effects of intravenous clonidine pretreatment on lactate induced panic, *Biol. Psychiatry* 31, pp. 135-146.

Crawley,J.N., Ninan,P.T., Pickar,D., Chrousos,G.P., Linnoila,M., Skolnick,P., Paul,S.M., 1985. Neuropharmacological antagonism of the beta-carboline-induced "anxiety" response in rhesus monkeys, *J. Neurosci.* 5, pp. 477-485.

Dahlström A, Fuxe K (1964). Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. I- Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons. *Acta Physiology Scand.*, 62, suppl., 232: 1-55.

Dannon, P. N., Iancu, I., e Grunhaus, L. (2002). The efficacy of reboxetine in the treatment-refractory patients with panic disorder: an open label study. *Human Psychopharmacology*, 17, 329-333.

Davies MF, Tsui JY, Flannery JA, Li X, DeLorey TM, Hoffman BB (2003). Augmentation of the Noradrenergic System in Alpha-2 adrenergic Receptor Deficient Mice: Anatomical Changes Associated With Enhanced Fear Memory. *Brain Research* 986: 157–165

- Davis,M., Redmond,D.E., Jr., Baraban,J.M., 1979. Noradrenergic agonists and antagonists: effects on conditioned fear as measured by the potentiated startle paradigm, *Psychopharmacology (Berl)*. 65, pp. 111-118.
- Deakin,J.F.W. e Graeff,F.G. (1991). 5-HT and mechanisms of defence. *Journal of Psychopharmacology* 5:305-315.
- Delagrange,P., Canu,M.H., Rougeul,A., Buser,P. e Bouyer,J.J. (1993). Effects of locus coeruleus lesions on vigilance and attentive behaviour in cat. *Behavioral Brain Research* 53(1-2):155-165.
- Devinsky,O., Morrell,M.J., Vogt,B.A., 1995. Contributions of anterior cingulate cortex to behaviour, *Brain* 118, pp. 279-306.
- DSM-IV (2000) American Psychiatry Association, Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, APA Press, Washington, DC, EUA, 4<sup>a</sup> Edição.
- Dymecki J, Lechowicz W, Bertrand E, Szpak GM (1996). Changes in dopaminergic neurons of the mesocorticolimbic system in Parkinson's disease, *Folia Neuropathol*. 34, pp. 102-106.
- Elrod R, Peskind ER, DiGiacomo L, Brodtkin KL, Veith RC, Raskind MA (1997). Effects of Alzheimer's Disease Severity on Cerebrospinal Fluid Norepinephrine Concentration. *Am. J. Psychiatry* 154: 25-30.
- Ennis et al., 1991 traba que mostra mcpd p parte rostral do lc
- Ennis,M., Behbehani,M.M., Shipley,M.T., Van Bockstaele,E.J., Aston-Jones,G., 1991. Projections from the periaqueductal gray to the rostromedial pericoerulear region and nucleus locus coeruleus: anatomic and physiologic studies, *J. Comp. Neurol*. 306, pp. 480-494.



- Floyd,N.S., Price,J.L., Ferry,A.T., Keay,K.A. e Bandler,R. (2000). Orbitomedial prefrontal cortical projections to distinct longitudinal columns of the periaqueductal gray in the rat. *Journal of Comparative Neurology* 422(4):556-578.
- Flügge G (1996). Alterations in the Central Nervous Alpha<sub>2</sub>-adrenoceptor System Under Chronic Psychosocial Stress. *Neuroscience* 75(1): 187-196.
- Flügge G, Jöhren O, Fuchs E (1992).<sup>3</sup>H-Rauwolscine binding sites in the brains of male tree shrews are related to social status. *Brain Research* 597: 131-137.
- Flügge G, van Kampen M, Meyer H, Fuchs E (2003). Alpha<sub>2A</sub> and Alpha<sub>2C</sub>-Adrenoceptor Regulation in the Brain: Alpha<sub>2A</sub> Changes Persist After Chronic Stress. *Eur. J. Neurosc.* 17: 917-928.
- Gentil,V. (1988). The aversive system, 5-HT and panic attacks. In *Animal Models of Psychiatric Disorders*, (eds. P. Simon, P. Soubrié and D. Wildlocher), pp. 142-145. Karger: Basel.
- German DC, Manaye KF, White CL, Woodward DJ, McIntire DD, Smith WK, Kaloria RN, Mann DM (1992). Disease-specific Patterns of Locus Ceruleus Cell Loss. *Ann Neurol.* 32: 667-676.
- Gilmor,M.L., Owens,M.J., Nemeroff,C.B., 2002. Inhibition of norepinephrine uptake in patients with major depression treated with paroxetine, *Am. J. Psychiatry.* 159, pp. 1702-1710.
- Gray,J.A. (1982). Précis of the Neuropsychology of Anxiety: An Enquiry into the Functions of the Septo-Hippocampal System. *Behavioral and Brain Sciences* 5:469-534.

- Gray, J.A. e McNaughton, N. (2000). *The Neuropsychology of Anxiety*. 2nd edn. Oxford Medical Publications: Oxford.
- Greenfield JG, Bosanquet FD (1953). The Brain-stem Lesions in Parkinsonism. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.* 16: 213-226.
- Grzanna, R., Berger, U., Fritschy, J.M., Geffard, M., 1989. Acute action of DSP-4 on central norepinephrine axons: biochemical and immunohistochemical evidence for differential effects, *J. Histochem. Cytochem.* 37, pp. 1435-1442.
- Gurguis GN, Andrews R, Antai-Onto D, Vo SP, Dikis EJ, Orsulak PJ, Rush AJ (1999). Platelet Alpha<sub>2</sub>-adrenergic Receptor Coupling Efficiency to Gi Protein in Subjects with Post-Traumatic Stress Disorder and Normal Controls. *Psychopharmacology (Berl.)* 141: 258-266.
- Halbach OB, Dermietzel R (2002). Neurotransmitters and Neuromodulators. In Halbach OB, Dermietzel R. *Norepinephrine*. Ed. Wiley-VCH, Verlag, Weinheim, 98-107.
- Heilbronner U, van Kampen M, Flügge G (2004). The Alpha<sub>2B</sub>-adrenoceptor in the Paraventricular Thalamic Nucleus is Persistently Upregulated by Chronic Psychosocial Stress. *Cellular and Molecular Neurobiology* 24(6): 815-831.
- Hertel P, Fagerquist MV, Svensson TH (1999). Enhanced Cortical Dopamine Output and Antipsychotic-like Effects of Raclopride by Alpha<sub>2</sub>-adrenoceptor Blockade. *Science* 286 (5437): 105-107.
- Hertel P, Fagerquist MV, Svensson TH (1999). Enhanced Cortical Dopamine Output and Antipsychotic-like Effects of Raclopride by Alpha<sub>2</sub>-adrenoceptor Blockade. *Science* 286 (5437): 105-107.

- Hill MP, Brotchie JM (1999). The Adrenergic Receptor Agonist, Clonidine, Potentiates the Anti-parkinsonian Action of the Selective  $\kappa$ -opioid Receptor Agonist, Enadoline, in the Monoamine-depleted Rat. *British Journal of Pharmacology* 128: 1577-1585.
- Jenck,F., Moreau,J.L. e Martin,J.R. (1995). Dorsal periaqueductal gray-induced aversion as a simulation of panic anxiety: elements of face and predictive validity. *Psychiatry Res.* 57(2):181-191.
- Jones BE, Friedman L (1983). Atlas of Catecholamine Perikaria, Varicosities and Pathways in the Brainstem of the Cat. *J. Comp. Neurol.* 215: 382-396.
- Jones BE, Moore RY (1977). Ascending Projections of the Locus Coeruleus in the Rat II. Autoradiographic Study. *Brain Research* 127: 23-53.
- Kahn,R.S., Asnis,G.M., Wetzler,S., Van Praag,H.M., 1988a. Neuroendocrine evidence for serotonin receptor hypersensitivity in panic disorder, *Psychopharmacology* 96, pp. 360-364.
- Kahn,R.S., Wetzler,S., Van Praag,H.M., Asnis,G.M., Strauman,T., 1988b. Behavioral indications for serotonin receptor hypersensitivity in panic disorder, *Psychiat. Res.* 25, pp. 101-104.
- Kalus, O., Asnis, G. M., Robinson, E., Kahn, R., Friedman, J. M., Iqbal, N., Grosz, D., Van Praag, H. M., e Cahn, W. (1991). Desipramine treatment in panic disorder. *Journal of Affective Disorders*, 21, 239-244.
- Karoum et al, 1980 livro de quimeoarquitertura

- Kiser,R.S., German,D.C. e Lebovitz,R.M. (1978). Serotonergic reduction of dorsal central gray area stimulation-produced aversion. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 9:27-31.
- Levine,E.S., Litto,W.J., Jacobs,B.L., 1990. Activity of cat locus coeruleus noradrenergic neurons during the defense reaction, *Brain Res.* 531, pp. 189-195.
- Libet, B. e Gleason, C. A. (1994). The human locus coeruleus and anxiogenesis. *Brain Research*, 634, 178-180.
- Liebowitz MR, Fyer AJ, McGrath P, Klein DF (1981). Clonidine Treatment of Panic Disorder *Psychopharmacology Bulletin* 17: 122-123.
- Lindvall O., Björklund A (1974b). The Glyoxylic Acid Fluorescence Histochemical Method: A Detailed Account of the Methodology for the Visualization of Central Catecholamine Neurons. *Histochemistry* 39: 97-127.
- Lindvall O., Björklund A (1974a). The organization of the ascending catecholamine neuron system in the rat brain as revealed by the glyoxylic acid fluorescence method. *Acta Physiology Scand. (Suppl)* 421: 1-48.
- Linnér L, Arborelius L, Nomikos GG, Bertilsson L, Svensson TH (1999). Locus Coeruleus Neurol Activity and Noradrenaline Availability in the Frontal Cortex of Rats Chronically Treated with Imipramine: Effects of Alpha2-adrenoceptor Blockade. *Biological Psychiatry* 46: 766-774.
- Lorenz W, Lomasneu JW, Collins S, Regan JW, Caron MG, Lefkowitz RJ (1990). Expression Three Alpha<sub>2</sub>-adrenergic Receptor Subtypes in

Rat Tissues: Implications for Alpha<sub>2</sub>-receptor Classification.  
Molecular Pharmacology 38: 599-603.

Lugon, A.B. (2006). Role of Central Noradrenergic System in the Defensive Behaviors produced by Electrical Stimulation of Periaqueductal Gray Matter of Rats. Master Degree Thesis: Federal University of Espírito Santo, Vitória, Brazil.

Lydiard, R. B. (1987). Successful utilization of maprotiline in a panic disorder patient intolerant of tricyclics. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, 7, 113-114.

Lydiard, R. B., Morton, W. A., Emmanuel, N. P., Zealberg, J. J., Laraia, M. T., Stuart, G. W., O'Neil, P. M., e Ballenger, J. C. (1993). Preliminary report: placebo-controlled, double-blind study of the clinical and metabolic effects of desipramine in panic disorder. *Psychopharmacology Bulletin*, 29, 183-188.

Mason, S.T., Fibiger, H.C., 1979. Anxiety: The locus coeruleus disconnection, *Life Sci.* 25, pp. 2141-2147.

McLeod DR, Hoehn-Sacaric R, Porges SW, Kowalski PA, Clark CM (2000). Therapeutic Effects of Imipramine are Counteracted by its Metabolite, Desipramine, in Patients with Generalized Anxiety Disorder. *J. Clin. Psychopharmacol* 20(6): 615-621.

Meller, S.T., Dennis, B.J., 1991. Efferent projections of the periaqueductal gray in the rabbit, *Neuroscience* 40, pp. 191-216.

Meyer H, Palchaudhuri M, Scheinin M, Flügge G (2000). Regulation of Alpha<sub>2A</sub>-adrenoceptor Expression by Chronic Stress in Neurons of the Brain Stem. *Brain Research* 880: 147-158.

- Moore RY, Bloom FE (1979). Central Catecholamine neuron system: Anatomy and physiology of the norepinephrine and epinephrine system. *Ann. Rev. Neurosci* 2: 113-168.
- Nardi, A. E., Nascimento, I., Valenca, A. M., Lopes, F. L., Mezzasalma, M. A., Zin, W. A., e Versiani, M. (2003). Respiratory panic disorder subtype: acute and long-term response to nortriptyline, a noradrenergic tricyclic antidepressant. *Psychiatry Res.*, 120, 283-293.
- Nashold Jr.,B.S., Wilson,W.P. e Slaughter,D.G. (1969). Sensations evoked by stimulation in the midbrain of man. *Journal of Neurosurgery* 30:14-24.
- Nieuwenhuys R (1985). Chemoarchitecture of the Brain. In: Nieuwenhuys R Survey of Chemically Defined Cell Groups and Pathways. Ed. Springer Verlag: Berlim, Alemanha, 7-44.
- Nybäck HV, Walters JR, Aghajanian GK, Roth RH (1975). Tricyclic Antidepressants: Effects on the Firing Rate of Brain Noradrenergic Neurons. *Eur J, Pharmacol* 32: 302-312.
- Pearson GD, Robinson RG (1981). Suction Lesions of the Frontal Cerebral Cortex in the Rat Induce Asymmetrical Behavioral and Catecholaminergic responses. *Brain Research* 218: 233-242.
- Posner MI (1995) Attention in Cognitive Neuroscience, an Overview. In: Gazzaniga MS (Ed) *The Cognitive Neuroscience*. MIT Press, Cambridge, EUA.
- Preter,M. e Klein,D.F. (2008). Panic, suffocation false alarms, separation anxiety and endogenous opioids. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*. 32(3):603-612.

- Raskin LA, Shaywitz BA, Anderson GM, Cohen DJ, Teicher MH, Liakis J (1983). Differential Effects of Selective Dopamine, Norepinephrine or Catecholamine Depletion on Activity and Learning in the Developing Rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 19: 743-749.
- Redmond DE, Huang YH, Snyder DR (1976b) Studies of the nucleus Locus Ceruleus in monkey and hypothesis for neuropsychopharmacology. In *Psychopharmacology: The Third Generation os Progress* (Ed. H. Y. Meltzer). Raven Press, New York, pp. 967-975.
- Redmond DE, Huang YH, Snyder DR, Maas JW (1976a) Behavioral effects of stimulation of the nucleus locus coeruleus in the stump-tailed monkey *Macaca arctoides*. *Brain Research* 116(2): 505-510.
- Redmond DE, Huang YH. (1979). II New Evidence for a Locus Coeruleus Norepinephrine Connection with Anxiety. *Life Sciences* 25(2): 2149-2162.
- Redmond,D.E., Huang,Y.H., Snyder,D.R., Maas,J.W., 1976. Behavioral effects of stimulation of the nucleus locus coeruleus in the stump-tailed monkey *Macaca arctoides*, *Brain Res.* 116, pp. 502-510.
- Roberts DCS, Price MTC, Fibiger HC (1976). The Dorsal Tegmental Noradrenergic Projection: an Analysis of its Role in Maze Learning. *J. Comp. Physiology Psychology* 90: 363-372.
- Roy-Byrne PP, Lewis N, Villacres E, Diem H, Greenblatt DJ, Shader RI, Veith R (1989). Preliminary Evidence of Benzodiazepine Subsensitivity in Panic Disorder. *Biol Psychiatry* 26 (7): 744-748.

- Russo-Neustadt A, Cotman CW (1997). Adrenergic Receptors in Alzheimer's Disease Brain: Selective Increases in the Cerebella of Aggressive Patients. *The Journal of Neuroscience* 17(14): 5573-5580.
- Sandkühler, J. (1991). Induction of the proto-oncogene c-fos as a cellular marker of brainstem neurons activated from the PAG. In A Depaulis e R Bandler (Eds.), *The Midbrain Periaqueductal Gray Matter. Functional, Anatomical and Neurochemical Organization* (pp. 267-286). New York, N.Y.:Plenum Press.
- Sandkuhler,J. e Herdegen,T. (1995). Distinct patterns of activated neurons throughout the rat midbrain periaqueductal gray induced by chemical stimulation within its subdivisions. *J.Comp Neurol.* 357(4):546-553.
- Sands SA, Strong R, Corbitt J, Morilak DA (1999). Effects of Acute Restraint Stress on Tyrosine Hydroxylase mRNA Expression in Locus Coeruleus of Wistar and Wistar-Kyoto Rats. *Molecular Brain Research* 75: 1-7.
- Sasson, Y., Iancu, I., Fux, M., Taub, M., Dannon, P. N., e Zohar, J. (1999). A double-blind crossover comparison of clomipramine and desipramine in the treatment of panic disorder. *European Neuropsychopharmacology*, 9, 191-196.
- Schenberg,L.C., Bittencourt,A.S., Sudré,E.C.M. e Vargas,L.C. (2001). Modeling panic attacks. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 25(7-8):647-659.
- Schenberg,L.C., Capucho,L.B., Vatanabe,R.O. e Vargas,L.C. (2002). Acute effects of clomipramine and fluoxetine on dorsal periaqueductal grey-



evoked unconditioned defensive behaviours of the rat.  
*Psychopharmacology* 159:138-144.

Schenberg, L.C., Póvoa, R.M.F., Costa, A.L., Caldellas, A.V., Tufik, S. e Bittencourt, A.S. (2005). Functional specializations within the tectum defense systems of the rat. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 29(8):1279-1298.

Seedat, S., van Rheede van Oudtshorn, E., Muller, J. E., Mohr, N., e Stein, D. J. (2003). Reboxetine and citalopram in panic disorder: a single-blind, cross-over, flexible-dose pilot study. *International Clinical Psychopharmacology*, 18, 279-284.

Southwick SM, Bremner JD, Rasmusson A, Morgan CA III, Arnsten A, Charney DS (1999). Role Norepinephrine in Pathophysiology and Treatment of Posttraumatic Stress Disorder. *Biological Psychiatry* 46(9): 1192-1204.

Southwick SM, Morgan CA III, Bremner JD, Grillon CG, Kristal JH Nagy LM (1997). Neuroendocrine Alterations in Posttraumatic Stress Disorder. In: Yehuda R, MacFarlane AC *Psychobiology os Posttraumatic Stress Disorder*. New York Academy os Sciences: Nova Iorque. 125-141.

Southwick SM, Yehuda R, Morgan CA III, (1995) Clinical Studies of Neurotransmitter Alterations in Posttraumatic Stress Disorder. In: Friedman MJ, Charney DS, Deutch AY, *Neurobiological an Clinical Consequences os Stress: From Normal Adaptation to Posttraumatic Stress Disorder*. Lippincott-Raven, Filadélfia, 335-350.

- Svensson TH (2003). Alpha-adrenoceptor Modulation Hypothesis of Antipsychotic Atypicity. *Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 27: 1145-1158.
- Svensson TH e Usdin T (1978). Feedback Inhibition of Brain Noradrenaline Neurons by Tricyclic Antidepressants: Alpha-receptor Mediation. *Science* 202: 1089-1091.
- Swanson LW, Mongenson GJ (1981). Neural Mechanisms for the Functional Coupling of Autonomic, Endocrine and Somatomotor Responses in Adaptive Behavior. *Brain Research Rev.* 3: 1-34.
- Szot P, White SS, Greenup JL, Leverenz JB, Peskind ER, Raskind MA (2006). Compensatory Changes in the Noradrenergic Nervous System in the Locus Ceruleus and Hippocampus of Postmortem Subjects with Alzheimer's Disease and Dementia with Lewy Bodies. *The Journal of Neuroscience* 26(2): 467-478.
- Takahashi Y, Satoh K, Sakumoto T, Tohyama M, Shimizu N (1979). A Major Source of Catecholamine Terminals in the Nucleus Tractus Solitarius. *Brain Research* 172: 372-377.
- Ungerstedt U (1971). Stereotaxic Mapping of the Monoamine Pathway in the Rat Brain. *Acta Physiologica (Scand.)- Suppl.* 367: 1-49.
- Vargas, L.C. e Schenberg, L.C. (2001). Long-term effects of clomipramine and fluoxetine on dorsal periaqueductal grey-evoked innate defensive behaviours of the rat. *Psychopharmacology (Berl.)* 155(3):260-268.
- Versiani, M., Cassano, G., Perugi, G., Benedetti, A., Mastalli, L., Nardi, A., e Savino, M. (2002). Reboxetine, a selective norepinephrine reuptake

inhibitor, is an effective and well-tolerated treatment for panic disorder. *Journal of Clinical Psychiatry*, 63, 31-37.

Westenberg,H.G.M. e Den Boer,J.A. (1993). Serotonergic basis of panic disorder. In *Psychopharmacology of Panic*, (ed. S. A. Montgomery), pp. 91-109. Oxford University Press: Oxford.

Westlund KN, Coulter JD (1980). Descending Projections of the Locus Coeruleus and Subcoeruleus/medial Parabrachial nuclei in Monkey: Axonal Transport Studies and Dopamine-b-hydroxylase Immunocytochemistry. *Brain Research Rev.* 2: 235-264.

Woods,S.W., Charney,D.S., Goodman,W.K. e Heninger,G.R. (1988). Carbon dioxide-induced anxiety. Behavioral, physiologic, and biochemical effects of carbon dioxide in patients with panic disorders and healthy subjects. *Arch.Gen.Psychiatry*. 45(1):43-52.